



Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Papel de la proteína p85 β en el cáncer de células
escamosas de pulmón**

Jesús Vallejo Díaz

Madrid, 2018



Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Papel de la proteína p85 β en el cáncer de células escamosas de pulmón

Jesús Vallejo Díaz

Licenciado en Biología

Dirigida por: **Dra. Ana Clara Carrera Ramírez**

Realizada en:

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)

Madrid, 2018

La ciencia no es solo una disciplina de razón, sino también de romance y pasión.

Stephen Hawking

Los científicos no persiguen la verdad; es ésta la que los persigue a ellos.

Karl Schlehta

ÍNDICE

RESUMEN	11
SUMMARY	15
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	23
1.- EL CÁNCER	25
1.1. El cáncer de pulmón.....	26
2.- FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASA (PI3K).....	29
2.1. Fosfoinosítidos	29
2.2. Clasificación de las PI3K.....	30
2.3. La ruta de PI3K.....	33
i. Ruta canónica	33
ii. Bucle de retroalimentación negativo.....	35
iii. Señalización entre las rutas PI3K y MAPK	36
3.- PI3K Y CÁNCER.....	36
3.1. Mutaciones de la ruta de PI3K en cáncer.....	36
3.2. Uso de inhibidores de la ruta de PI3K en la clínica	38
3.3. Variación de los niveles de expresión de p85 α y p85 β (<i>Isoform switch</i>).....	40
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS	47
MATERIALES.....	49
Líneas Celulares.....	49
Anticuerpos.....	49
Bases de datos.....	50
Soluciones tampón	50
Plásmidos	50
Ratones.....	51
Otros materiales.....	51
Programas de análisis.....	51
MÉTODOS	52
Transfección celular	52
Curvas de resistencia G418	52
Generación líneas celulares estables.....	52
Cuantificación <i>Western Blot</i>	53
Ensayos de xenotrasplantes.....	53

Ensayo de activación de la proteína FAK a través de integrinas.....	54
Ensayo de precipitación de proteínas con microesferas de agarosa	55
Espectrometría de masas Triple-TOF	55
Ensayo de pulso y caza de bromodesoxiuridina (BrdU).....	55
Ensayo de fraccionamiento celular	56
Ensayo de inmunoprecipitación (IP)	57
RESULTADOS	59
1.- NIVELES DE P85 β EN DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER DE PULMÓN.....	61
2.- ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PI3K EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PULMÓN	62
2.1. Determinación de los niveles de expresión de p85 β y p85 α en SqCLC.....	62
2.2. Determinación del ratio p85 β /p85 α en SqCLC.....	63
3.- ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE PI3K EN LÍNEAS SqCLC TRAS REDUCIR LOS NIVELES DE P85 α O P85 β	64
4.- ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE P85 β EN LA ACTIVACIÓN DE FAK POR INTEGRINAS	69
5.- ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LA IMPLICACIÓN DE P85 β Y P85 α EN EL CRECIMIENTO TUMORAL EN LÍNEAS CELULARES DE SqCLC.	71
5.1. Estudio de xenógrafos tras el silenciamiento de p85 β o p85 α	71
5.2. Análisis histológico de los tumores a tiempo medio: marcadores celulares de apoptosis y mitosis.....	77
5.3. Estudio de xenógrafos tras el silenciamiento de p85 β a tiempo prolongado.....	78
6.- IMPLICACIÓN DE P85 β EN EL CICLO CELULAR.....	80
7.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE P85 β EN LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN NEGATIVA DE LA RUTA DE PI3K Y COMPARACIÓN CON EL USO DE INHIBIDORES.....	83
8.- DIFERENCIAS EN PROTEÍNAS ASOCIADAS A P85 α Y P85 β	88
8.1. Diferencias en secuencia entre p85 α y p85 β	88
8.2. Ensayo de <i>Pull Down</i>	90
8.3. Validación de dianas del <i>Pull Down</i>	91
DISCUSIÓN	99
CONCLUSIONES	111
ANEXOS.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	119

RESUMEN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que, anualmente, registra una mayor tasa de mortalidad en el mundo. Este tipo de cáncer se clasifica, en base a su histología, en cáncer de células pequeñas y no pequeñas, y, dentro de este último grupo, en adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma de células escamosas (SqCLC).

Las enzimas fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) son una familia de proteínas con actividad quinasa que están implicadas en múltiples funciones celulares como proliferación, migración, supervivencia, tráfico vesicular y biosíntesis de proteínas. Las PI3K de clase IA se componen de una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85), ambas con varias isoformas. En el caso de p85, tanto p85 α como p85 β se expresan de manera ubicua, aunque el nivel de expresión de la isoforma alfa es mayor que la de beta en condiciones basales. Sin embargo, en el cáncer de mama y de colon se ha descrito un cambio en los niveles de expresión de ambas isoformas, siendo p85 β la expresada mayoritariamente. En esta tesis se muestra que en el SqCLC también hay un cambio de expresión de p85 α y p85 β . En los estudios *in vitro*, el silenciamiento de p85 β provocó una reducción en los niveles de activación de la ruta de PI3K en varias líneas de SqCLC. En los estudios *in vivo*, se determinó que p85 β , y no p85 α , está implicada en el mantenimiento de la masa tumoral, observando una regresión en la mayoría de las líneas de SqCLC tras el silenciamiento de p85 β . Por su parte, el silenciamiento de p85 α no tuvo efecto, apoyando la hipótesis de que la subunidad p85 β es la implicada en la progresión tumoral en el SqCLC.

Existen inhibidores de la ruta de PI3K, en diferentes etapas de ensayos clínicos (alguno aprobado para su uso), dirigidos contra las diferentes isoformas de p110, o contra otros efectores de la ruta, como Akt o mTOR. Uno de los principales problemas de estos inhibidores es que generan resistencias y reactivación de la ruta, por lo que proponemos el desarrollo de agentes interferentes contra la subunidad p85 β . A diferencia del tratamiento con inhibidores, la interferencia de p85 β no produjo reactivación de la ruta de PI3K a tiempos largos. Además, en estudios *in vivo*, se observó que el silenciamiento de p85 β producía regresión tumoral y, a largo plazo, tampoco reactivaba ruta de PI3K.

Nuestros datos sugieren que la subunidad reguladora p85 β es una nueva diana terapéutica para el tratamiento de SqCLC.

SUMMARY

Lung cancer exhibits the highest mortality index worldwide among different types. Based on histological analysis, lung cancer is classified as small-cell and non-small-cell lung cancers; this second group is comprised by lung adenocarcinoma, large-cell lung carcinoma and squamous cell lung carcinoma (SqCLC).

The PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) enzymes are a protein family with kinase activity that are involved in several cell functions such as proliferation, migration, survival, vesicle trafficking and protein biosynthesis. PI3K class IA is composed of a catalytic subunit (p110) and a regulatory subunit (p85), and both have various isoforms. In the case of p85, both p85 α and p85 β are expressed in all cells, although in normal cells p85 α expression is higher than that of p85 β . In breast and colon carcinoma, however, there is a switch in isoform expression, with p85 β the most highly expressed. In this thesis, we show that there is also a p85 α /p85 β isoform switch in SqCLC. Our *in vitro* studies show that p85 β depletion reduces the activation state of the PI3K pathway in some SqCLC cell lines. In *in vivo* studies, we determined that p85 β , and not p85 α , is involved in the maintenance of tumour survival, with tumour regression in most xenografts derived from SqCLC cell lines after p85 β depletion. p85 α depletion had no effect, which supports our hypothesis that the p85 β subunit is the isoform implicated in SqCLC tumour progression.

Numerous PI3K pathway inhibitors are currently being tested in different clinical trial phases (some have already been approved for clinical use); these inhibitors target different p110 isoforms or other PI3K pathway effectors, such as Akt or mTOR. One of the most important problems of inhibitors is that they produce resistance and PI3K pathway reactivation; for this reason, we propose to develop agents that interfere with the p85 β regulatory subunit. In contrast to inhibitors, interference with p85 β did not produce PI3K pathway reactivation after long treatment periods. In addition, in *in vivo* assays, p85 β depletion produced tumour shrinkage and, after long treatment periods, PI3K pathway activity continued to be repressed.

These findings suggest the p85 β regulatory subunit as a therapeutic target for treatment of squamous cell lung carcinoma.

ABREVIATURAS

ABD	<i>Adaptor-Binding Domain</i>
Ad/Adeno	Adenocarcinoma
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AOM	Azoximetano
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
APC/C	Complejo Promotor de la Anafase/Ciclosoma
BcR	<i>Break cluster Region Homology</i>
BrdU	Bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina)
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Doxi	Doxiciclina
DSS	Sulfato de dextrano
DSMZ	Del alemán, <i>Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENU	N-etil-N-nitrosourea
EXP	Exponencial
FAK	Quinasa de Adhesión Focal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN	Fibronectina
FOXO	<i>Forkhead box O-class</i>
GPCR	Proteína G acoplada a receptores
GST	Glutación-S-Transferasa
HE	Hematoxilina y Eosina
IP	Inmunoprecipitación
Ly	Ly294002 (Inhibidor pan-PI3K)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NPC	Complejo del Poro Nuclear
OH	Grupo hidroxilo
PBS	Tampón fosfato salino

PD	<i>Pull Down</i>
PH	Dominio de homología con Plekstrina
PI	Fosfoinosítido
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIK	PIK75 (Inhibidor específico de p110 α)
PM	Peso Molecular
PtdIns	Fosfoinositoles
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homology</i>
PX	Dominio Phox
R1CA	p85 α /p110 α
R1CB	p85 α /p110 β
R2CA	p85 β /p110 α
R2CB	p85 β /p110 β
RBD	<i>Ras-Binding Domain</i>
RTK	Receptor tirosina-quinasa
Scid	<i>Severe Combined Immune Deficiency</i>
SD	Desviación Estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SEM	Error estándar medio
Ser (S)	Serina
SH	Dominio de homología con Src
shRNA	<i>Short harpain RNA</i>
SN	Sobrenadante
SqCLC	Cáncer de células escamosas de pulmón
Str	<i>Starving</i>
TGX	TGX221 (Inhibidor específico de p110 β)
Thr (T)	Treonina
TSC	Complejo Tubero-Esclerosis
Tyr (Y)	Tirosina
WB	<i>Western blot</i>
WHIP	<i>Werner Helicase-Interacting Protein</i>
WRNIP1	<i>Werner-Interacting Protein 1</i>
WT	<i>Wild type</i>

INTRODUCCIÓN

1.- El cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el aumento descontrolado de la proliferación en casi cualquier tipo celular del organismo, y que acaba provocando la diseminación de estas células transformadas desde el órgano primario a otros tejidos. La patología neoplásica constituye una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Se estima que en el año 2015 se diagnosticaron más de 14 millones de nuevos casos, y que provocó la muerte prematura a casi 9 millones de personas [1].

El cáncer puede aparecer de manera espontánea en cualquier momento de la vida de un individuo. Las causas de su aparición son muy variadas, aunque se pueden agrupar en 2 grupos: aquellas asociadas a factores genéticos, o a factores ambientales. En cuanto a los factores genéticos, existen ciertas modificaciones génicas que pueden predisponer hacia un determinado tipo de cáncer, y se pueden adquirir bien sea en la herencia genética, o bien por la aparición de mutaciones puntuales. En cuanto a los factores ambientales, éstos pueden ser de carácter físico, como la radiación ionizante o la ultravioleta; por agentes químicos, como son: el asbesto, los diversos componentes del tabaco, la aflatoxina (que se encuentra en algunos alimentos contaminados) y el arsénico. Por último, también existen factores biológicos que pueden provocar la transformación de células normales en células tumorales, por medio de infecciones víricas, bacterianas o de parásitos [1].

**Los 10 tipos de cáncer más comunes en el mundo
(2012, datos estimados)**

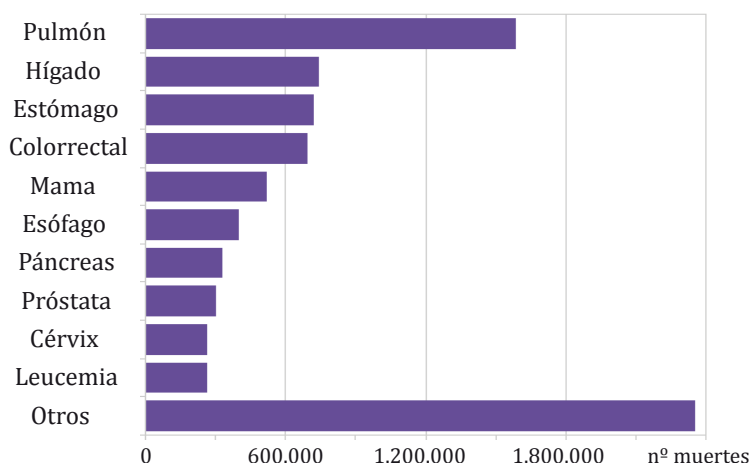


Figura 1.- Principales tipos de cáncer, año 2012 (Adaptado de Ferlay J, 2013).

El cáncer se puede clasificar en base al órgano o tejido de origen de la enfermedad, y actualmente están descritos más de 100 tipos distintos de cáncer, siendo los más frecuentes el cáncer de pulmón, el de hígado y el de estómago (**Figura 1**).

1.1. El cáncer de pulmón

Varias estimaciones han determinado que el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que presenta una mayor tasa de muerte anual en todo el mundo (más del doble que el segundo tipo más agresivo, el cáncer hepático) [1] (**Figura 1**). Además de ser el primero en número de muertes anuales en ambos sexos, también es el primero en hombres, y el tercero en mujeres, en número de nuevos casos diagnosticados anualmente. Estos datos ponen de manifiesto que el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que en la actualidad tiene más impacto en la población mundial. Los diferentes tipos de cáncer de pulmón pueden ser clasificados en primer lugar según datos histológicos, y a continuación en subgrupos, según los patrones de expresión génicos concretos que se correlacionan con distintas características como mayor diferenciación tumoral o una peor prognosis [2]. Incluso, el análisis genómico puede discernir si el tumor de un paciente puede ser clasificado en un determinado grupo por medio de marcadores genéticos, cuando no puede ser bien descrito tras el análisis histológico [3]. Otro método de estudio es, en lugar de los análisis genómicos, realizar un análisis del transcriptoma, y determinar las interacciones específicas que se relacionan con un subgrupo concreto de cáncer de pulmón [4].

El cáncer de pulmón se clasifica, en base a su histología, en dos grupos principales: el cáncer de pulmón de células pequeñas y el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Este segundo grupo, a su vez, se divide en otro tres tipos principales: adenocarcinoma (50%) carcinoma de células grandes (20%) y carcinoma de células escamosas de pulmón (SqCLC) (30%) [5].

Diversos análisis genómicos, principalmente en el marco del Proyecto sobre el Genoma Humano, han identificado alteraciones génicas en los distintos tipos de cáncer. En el cáncer de pulmón se han analizado, a nivel genómico, 1144 muestras de pacientes. En este estudio, el 53,3% del total de las muestras de diferentes subtipos de cáncer de pulmón han resultado positivas para algún tipo de mutación, amplificación o silenciamiento génico, o múltiples alteraciones, en alguno de los genes implicados en la ruta de PI3K [6]. En el análisis de muestras de pacientes con cáncer de pulmón de

células no pequeñas, se observó una gran variabilidad de mutaciones identificadas en oncogenes y genes relacionados con la progresión tumoral. En concreto, los subgrupos de adenocarcinoma y de SqCLC mostraron diferentes patrones de mutaciones presentes en biomarcadores conocidos, como son las mutaciones en los diferentes receptores de factores de crecimiento, en las proteínas K-Ras o ALK (**Figura 2**) [5]. Existen diferentes mutaciones comunes para muchos tipos de cáncer, y otras que son específicas de tipos concretos. En los casos de cáncer de pulmón de células no pequeñas se han descrito un conjunto de mutaciones frecuentes (mayor o igual al 1%) en los genes *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *DDR2*, *EGFR*, *FGFR1*, *HER2*, *KRAS*, *MEK1*, *MET*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *RET* y *ROS1* [7]. Mientras que las mutaciones en los genes *EGFR* y *KRAS* son frecuentes en el adenocarcinoma, y raramente detectados en los tumores de SqCLC, las mutaciones en el gen *FGFR1* se han detectado en ambos tipos tumorales; por otra parte, en los tumores de SqCLC, y no en los otros subtipos, se han determinado mutaciones específicas en los genes *TP53*, *RB1*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *PIK3CA* y *NF1*. Más concretamente, el análisis de 178 muestras procedentes de una cohorte de pacientes con SqCLC mostró que todas ellas presentaban algún tipo de variación génica, bien sea una mutación, una amplificación o silenciamiento génico, o una alteración genómica, con una tasa de entre 0,5 y 3 mutaciones por megabase [8]. Entre estas variaciones génicas se encontraban varios biomarcadores relacionados con la ruta de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), bien de manera directa, por una mutación puntual o una amplificación del gen *PIK3CA*, o indirecta, mediante alteraciones en receptores de membrana o en la fosfatasa PTEN (**Figura 2**).

Tanto en el subgrupo de adenocarcinoma como en el SqCLC, existe un amplio grupo de pacientes en los cuales, a pesar del alto número de mutaciones, no se han determinado las mutaciones conductoras o también llamadas “*driver*” (esenciales para la adquisición del fenotipo tumoral y su mantenimiento), lo que conlleva una ausencia de dianas para dirigir los tratamientos. Este desconocimiento de mutaciones “*driver*”, en grupos de pacientes numerosos (en torno al 40% en Adenocarcinoma y 20% en SqCLC), dificulta el desarrollo de un tratamiento dirigido [5].

Actualmente hay varios tipos de tratamientos contra el cáncer de pulmón. Los tratamientos más comunes son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la inmunoterapia, la terapia dirigida y la terapia hormonal.

**Clasificación Cáncer de Pulmón
de células no pequeñas (por histología)**

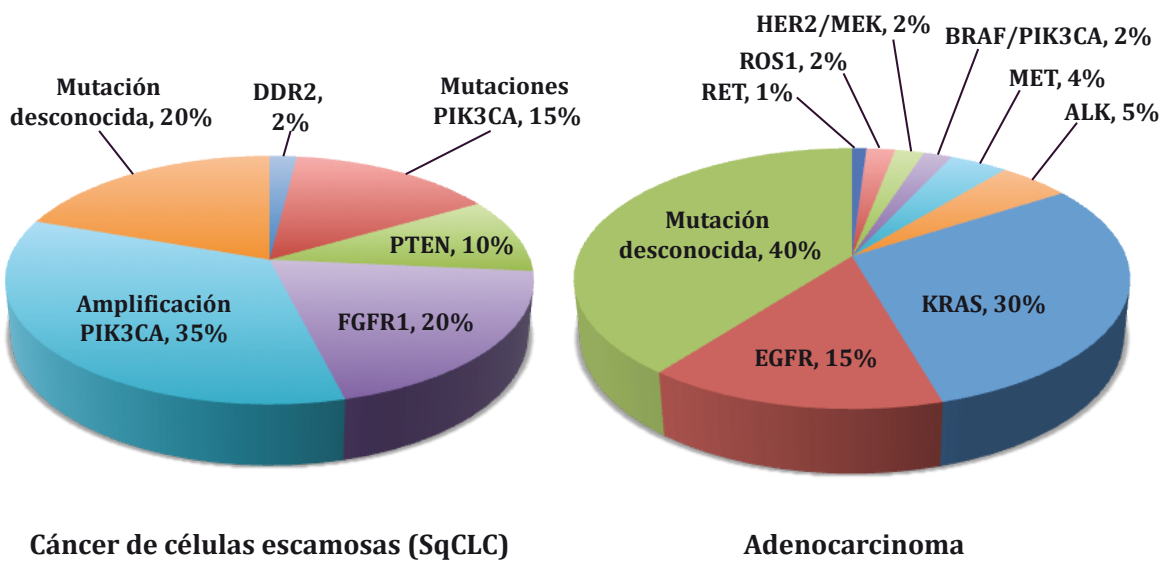
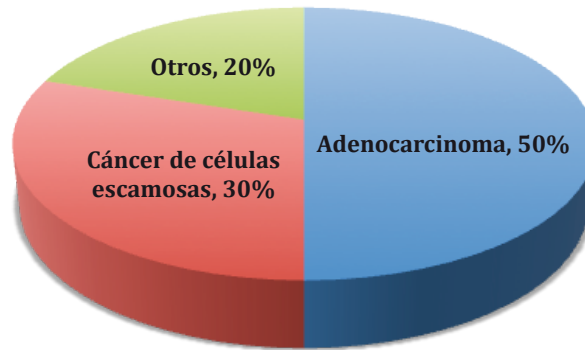


Figura 2.- Mutaciones conductoras determinadas en pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas. (Adaptado de Chan BA & Hughes BGM, 2014) .

Algunos de estos tratamientos, como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, son inespecíficos y presentan diversos efectos secundarios. Por el contrario, las nuevas terapias están dirigidas contra una diana específica, como es el caso de la inmunoterapia, la terapia dirigida basada en biomarcadores relacionados con el cáncer, la terapia hormonal, el uso de células madre y la medicina de precisión, que pretende hacer sub-clasificaciones de los tumores en base a patrones genéticos para poder dar un tratamiento específico a cada subgrupo de tumores (tratamientos personalizados). La mayoría de estas terapias tienen su base en marcadores moleculares mutados, y su uso está orientado hacia dichas alteraciones génicas. Sin embargo, pese a que se conocen muchas de las alteraciones presentes en los tumores, no existen terapias desarrolladas

para muchas de ellas, o todavía se encuentran en fase de desarrollo. Este es el caso, por ejemplo, de los tumores en los que se ha producido una mutación en los genes codificantes para las proteínas con función supresora de tumores, como son las proteínas p53 o Retinoblastoma. De las diferentes terapias desarrolladas, se han realizado ensayos clínicos con distintos compuestos, como son los β -carotenos, el α -tocoferol, y un largo etcétera, aunque ninguno demostró tener beneficios para los pacientes [9–13]. Finalmente, para la posible aplicación de nuevos tratamientos personalizados, sería necesario la secuenciación del genoma completo de los pacientes, que actualmente no es factible en clínica.

2.- Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)

Las fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) son una familia de enzimas con actividad quinasa, implicadas en múltiples funciones celulares como la supervivencia y el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la migración celular, y el tráfico vesicular. Las enzimas PI3K son capaces de fosforilar la posición 3' hidroxilo (-OH) del anillo inositol de los fosfatidilinositoles (PtdIns), dando como resultado diferentes fosfoinosítidos: PI(3)P, PI(3,4)P₂ o PI(3,4,5)P₃ [14,15].

2.1. Fosfoinosítidos

Los fosfoinosítidos (PI) forman parte de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares, como son la membrana plasmática, la membrana nuclear y las membranas de diferentes orgánulos (retículo endoplasmático, aparato de Golgi, etc.). Son derivados del glicerol, y están constituidos por dos ácidos grasos apolares en las posiciones C1 y C2, y una cabeza polar en la posición C3 del glicerol, donde se une el anillo de inositol. Esta dualidad confiere a los fosfoinosítidos un carácter anfipático. Según su localización en la célula, los fosfoinosítidos se encuentran en diferente cantidad y composición, dependiendo de sus ácidos grasos o del número de grupos fosfato que contenga cada molécula en el grupo -OH de las posiciones 3, 4 ó 5 del anillo inositol [16]. Estos fosfolípidos actúan como segundos mensajeros en las células, funcionando como puntos de unión y activación de múltiples proteínas efectoras que se unen a los PI a través de dominios específicos de unión a lípidos, entre los que se encuentran los dominios PH (*Plescktrin homology domain*), PX (*Phox domain*) o FYVE [17].

2.2. Clasificación de las PI3K

La familia de las PI3K está dividida en tres clases, atendiendo a su estructura y especificidad de sustrato [18] (**Figura 3**).

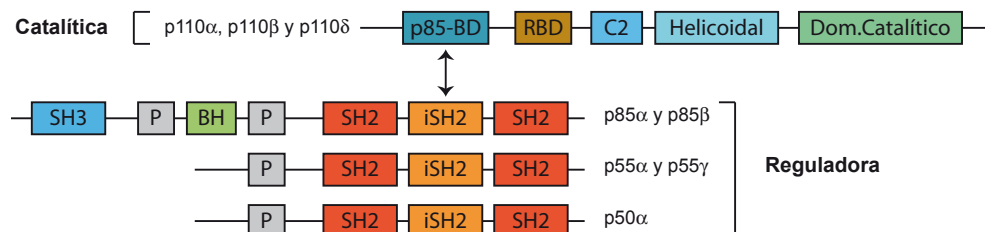
Las PI3K de clase I son heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica llamada p110 y una subunidad reguladora. Estas enzimas presentan una mayor especificidad por el sustrato PI(4,5)P₂, y se dividen a su vez en dos subgrupos, llamados IA y IB, en función del receptor por el cual es activado cada uno. La clase IA se activa principalmente por receptores con actividad tirosina quinasa (RTK), si bien p110β es capaz de activarse también por receptores acoplados a proteínas G o GPCR (del inglés; *G protein-coupled receptor*) [19]. En las PI3K de clase I, la subunidad catalítica p110 tiene 4 isoformas diferentes, llamadas p110α, p110β, p110δ y p110γ, las cuales son codificadas por distintos genes (*PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD* y *PIK3CC*, respectivamente) y todas presentan una alta homología entre sí. Mientras que las 3 primeras isoformas (p110α, p110β y p110δ) pertenecen a la clase IA, la isoforma p110γ pertenece a la clase IB, que carece del dominio N-terminal de unión a p85 y se asocia con otras subunidades reguladoras distintas. Dentro de las subunidades catalíticas de la clase IA, las isoformas p110α y p110β se expresan de manera ubicua, mientras que p110δ se expresa principalmente en los linajes celulares hematopoyéticos [20]. La subunidad reguladora está codificada por 3 genes distintos: el gen *PIK3R1* codifica para la proteína p85α, si bien por un procesamiento alternativo puede formar otras subunidades (p55α y p50α), el gen *PIK3R2* codifica para la proteína p85β, y el tercer gen, *PIK3R3*, que codifica la proteína p55γ.

Las PI3K de clase IB están formadas por la subunidad catalítica p110γ y por una subunidad reguladora que puede ser p101 o p87 [21,22], y su función está relacionada con el sistema inmune y la inflamación. Las PI3K de clase II está compuesta únicamente por una subunidad catalítica, sus sustratos principales son el PI y el PI(4)P [23], y se le atribuyen diversas funciones relacionadas con el tráfico vesicular. Por último, la PI3K de clase III está compuesta por una subunidad catalítica (Vps34) y una subunidad reguladora (Vps15), y participa en procesos como la autofagia y la endocitosis [24].

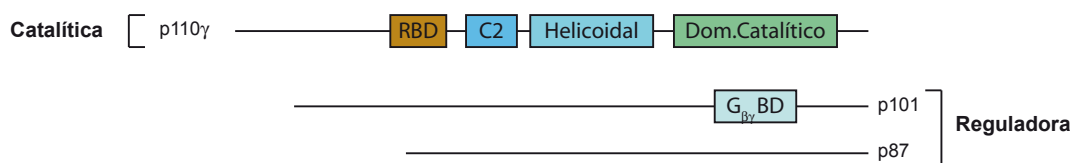
Dentro de las PI3K de clase IA, la subunidad catalítica p110 posee la actividad quinasa lipídica y es capaz de fosforilar los PI en su posición 3' -OH, aunque también ha sido

Isoformas de ambas subunidades

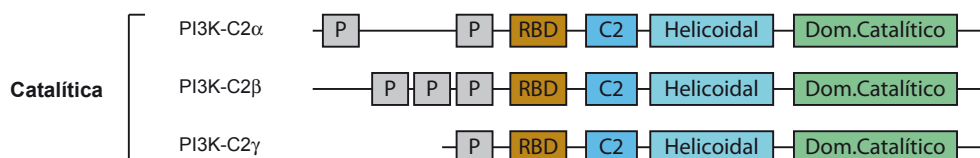
Clase IA



Clase IB



Clase II



Clase III

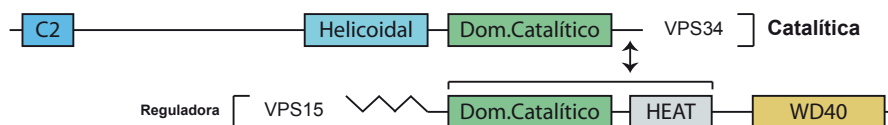


Figura 3.- Clasificación de la familia de las PI3K. p85-BD = Dominio de unión a p85, RBD = Dominio de unión a Ras, C2 = Dominio de asociación a membrana, SH3 = Dominio de unión a regiones ricas en Prolina, P = Región rica en Prolina, BH = "Breakpoint cluster Homology", G γ BD = Dominio de unión a proteínas G γ , Heat = Dominio Heat, WD40 = Dominio WD40. Adaptado de Thorpe LM, 2015.

descrita su capacidad de fosforilar y activar directamente a la proteína Akt [25]. A su vez, la subunidad reguladora es la encargada de estabilizar y regular la actividad de la subunidad catalítica a la vez que también media en el reconocimiento y la unión a receptores de membrana activados [26].

Las subunidades p110 de clase IA están constituidas, desde la región N-terminal hacia la C-terminal, por los siguientes dominios: el dominio de unión a p85 o ABD (del inglés *Adaptor-Binding Domain*); un dominio de unión a Ras o RBD (del inglés *Ras-Binding Domain*), que contribuye a la activación de p110 [27]; el dominio C2, de asociación a la membrana; un dominio helicoidal, que establece contactos con la subunidad p85; y finalmente, el dominio catalítico, con actividad quinasa [28].

Las subunidades reguladoras p85 α y p85 β se expresan de manera ubicua en todas las células, siendo p85 α la que tiene mayores niveles de expresión en células normales (no tumorales) [29]. En cuanto a su estructura, las isoformas de p85 también están formadas por varios dominios, en dirección N- a C-terminal: el dominio SH3 (del inglés *Src-homology domain 3*), con afinidad por regiones ricas en prolina, como son los motivos 'xPPxP' y 'RxLPPRPxx' que se encuentran, entre otras, en las proteínas adaptadoras que sirven de puente entre los receptores tirosina-quinasa activos y otras proteínas. Además, este dominio también reconoce a las regiones ricas en prolina que tienen las propias p85, flanqueando el siguiente dominio (BcR), pudiendo formarse homodímeros de p85 [30]. A continuación del dominio SH3 está el dominio BcR (del inglés *Break cluster Region homology*), el cual es capaz de unir diferentes proteínas GTPasas monoméricas como Rac y Cdc42, participando en diversas funciones como la activación de GTPasas, la reorganización de citoesqueleto y la interacción con otros dominios BcR [31,32]. Tras esta región, se encuentran dos dominios SH2, que se denominan nSH2 y cSH2, según su proximidad al extremo N- o C-terminal. Los dominios SH2 unen tirosinas fosforiladas dentro de motivos 'pYxxM', y permiten la interacción directa entre p85 y los receptores tirosina-quinasa activados, acercando la subunidad catalítica p110 a la membrana plasmática. Entre ambos dominios se encuentra la región inter-SH2, que media en la unión con la subunidad catalítica para formar el heterodímero p85-p110.

La interacción entre p110 y p85 se produce a través del dominio ABD de p110 y el dominio inter-SH2 de p85; también hay una asociación entre p85 y los dominios C2 y helicoidal de p110, que estabiliza el heterodímero [28]. La unión entre p85 y p110 induce la estabilización de p110, mantiene a ésta inactivada, y regula su activación tras la unión de p85 a las tirosinas fosforiladas de los receptores de membrana o de las proteínas adaptadoras que median en la señalización receptor-PI3K [26]. Además, en el caso de p110 α , la unión p85-p110 α evita que ésta sea ubiquitinada y degradada vía proteasoma [33]. La subunidad reguladora p85 también presenta una serie de funciones independientes de p110: forma parte de la organización del citoesqueleto, por medio de la unión a Cdc42 en los procesos de migración celular y citocinesis [34,35], está implicada en el aumento de adhesiones celulares y en la formación de los contactos focales en procesos de invasión celular y metástasis [36]. p85 presenta también una función de andamiaje ("*scaffold*"), formando complejos macromoleculares con otras

proteínas [37,38]. Hay trabajos que demuestran la formación de complejos moleculares del heterodímero p110-p85 con otras proteínas. La proteína PTEN (del inglés *Phosphatase and tensin homology*) es una fosfatasa capaz de desfosforilar los PI en la posición 3' -OH [39], revertiendo el efecto de PI3K. PTEN es capaz de unirse a la subunidad p85, a través de su región N-terminal (requiere de los dominios 'SH3-BcR') [40]. La formación de este complejo PI3K-PTEN permite un acercamiento de PTEN a la membrana plasmática, para regular los niveles de PI(3,4,5)P₃, tras una señal de activación extracelular. También se ha descrito que la activación de p110 provoca una rápida activación de la actividad fosfatasa de PTEN. El proceso de activación de PI3K, generando mayores niveles de PI(3,4,5)P₃ en la membrana, y activando al mismo tiempo PTEN, muestra un proceso de regulación de la señalización celular altamente controlado [38].

2.3. La ruta de PI3K

i. Ruta canónica

La ruta de señalización de PI3K comienza por la activación de los receptores de membrana, que pueden ser GPCR o RTK. La unión ligando-receptor provoca la fosforilación de tirosinas de la región citosólica de los receptores, creando motivos de reconocimiento para las proteínas que posean dominios SH2, como es p85 [41]. Las enzimas PI3K pueden ser activadas por medio de la unión directa a los RTK, y también, en el caso de p110β, por la unión directa con el dímero Gβγ de los GPCR [19]. Otro mecanismo de activación de PI3K es a través de la interacción directa entre p110 y GTPasas monoméricas [27]. Además, las PI3K también se pueden activar de manera indirecta a través de proteínas adaptadoras con dominios SH2, que se unen a los receptores fosforilados, y sirven de anclaje para formar complejos proteicos próximos a la membrana plasmática [42].

La enzima PI3K compuesta por el heterodímero p85-p110 es capaz de reconocer los residuos de tirosina fosforilados en las regiones citosólicas de los receptores de membrana, pudiendo unirse a ellos a través de los dominios SH2 de p85; por otra parte, las PI3K también son capaces de reconocer, por medio del dominio SH2 de p85, a las tirosina quinasas de la familia del Src y otras proteínas adaptadoras que posean dominios SH2 y regiones ricas en prolinas [43]. De ambas formas, se produce la unión de la PI3K con el receptor de membrana activado.

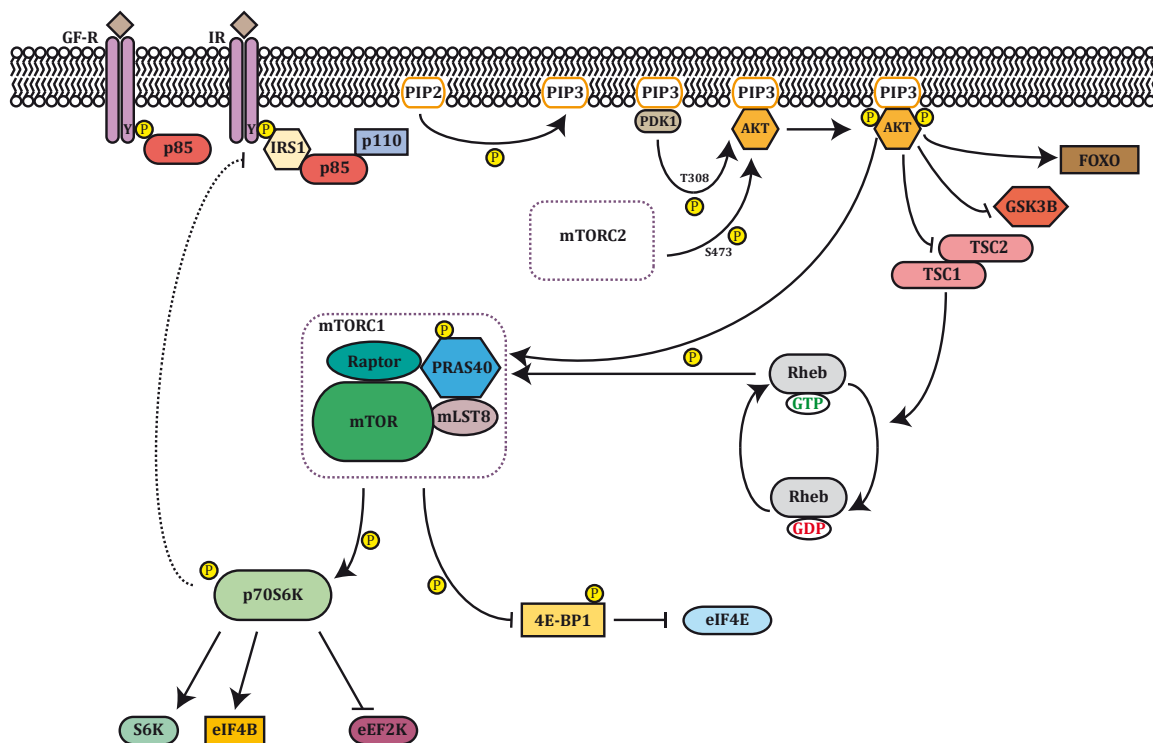


Figura 4 .- Ruta de señalización canónica de PI3K. Adaptado de Meric-Bernstam F & González-Angulo J, 2009.

Tras la interacción receptor-(adaptador)-PI3K, la subunidad p110 sufre un cambio conformacional que aumenta su actividad y se encuentra próxima a la membrana plasmática, donde se encuentran los diferentes PI. El sustrato principal de la PI3K de clase I es el $PI(4,5)P_2$, que tras su fosforilación pasa a formar $PI(3,4,5)P_3$ [44]. Este $PI(3,4,5)P_3$ actúa en membrana como un segundo mensajero, participando en múltiples rutas de señalización celular, sirviendo como punto de unión y activación de diferentes proteínas como la proteína PDK1. Tras la unión a $PI(3,4,5)P_3$, PDK1 sufre un cambio conformacional y se auto-fosforila, pasando a un estado activo que permite que pueda fosforilar a la proteína Akt (también llamada proteína quinasa B) [45]. Akt es una proteína con actividad serina-treonina quinasa que también se une al $PI(3,4,5)P_3$ de membrana donde, posteriormente, requiere de dos fosforilaciones secuenciales en sus residuos Thr308 y Ser473 (llevadas a cabo por PDK1 y mTORC2, respectivamente) para pasar a un estado activo [46]. La proteína Akt es capaz de fosforilar una gran variedad de proteínas. Entre las relacionadas con la ruta de PI3K, Akt fosforila al complejo TSC2/TSC1 (del inglés *Tubero Sclerosis Complex 2/1*), provocando su inhibición. El complejo TSC2/TSC1 actúa como un activador de la actividad GTPasa de la proteína Rheb, que se encuentra activa y unida a un grupo GTP. El complejo TSC2/TSC1 produce

la desfosforilación de GTP-Rheb, pasando a GDP-Rheb, en el cual la proteína Rheb se encuentra inactiva. La inactivación del complejo TSC2/TSC1 por Akt permite la activación de la proteína Rheb, necesaria para la transmisión de la señal de activación, ya que permite la fosforilación de la proteína PRAS40, perteneciente al complejo mTORC1. PRAS40 es una proteína que mantiene unido e inactivo al complejo mTORC1, y que también puede ser fosforilado de manera directa por la proteína Akt [47]. La fosforilación de PRAS40 (y otros eventos adicionales) provocan la activación del complejo mTORC1, el cual va a fosforilar a otros efectores como son el factor de iniciación de la transcripción 4EBP1, o la proteína p70S6K, una proteína con actividad serina-treonina quinasa implicada en diferentes funciones biológicas como la biogénesis de ribosomas (**Figura 4**). Esta proteína, además de continuar en la transducción de señales de la ruta PI3K, también tiene un papel clave en la regulación de la activación de la propia PI3K [48].

Tras la unión de los receptores de membrana con sus ligandos, la activación de la ruta de PI3K es transitoria, y debe de estar bien regulada para evitar un aumento de las señales intracelulares que inducen supervivencia, migración y proliferación celular. Por ello, aparte de los mecanismos de activación, existen diversos procesos que regulan negativamente la activación de la vía a diferentes niveles. En primer lugar, la proteína PTEN desfosforila el grupo fosfato de la posición 3' del anillo inositol de los fosfolípidos PI(3,4,5)P₃, de modo que permite una regulación específica de los niveles de PI(4,5)P₂-PI(3,4,5)P₃. Se ha descrito que la activación de PTEN tiene lugar posteriormente a la activación de PI3K, siendo necesaria la activación previa de p110β [38]. Este mecanismo permite la activación durante un tiempo determinado de la ruta de PI3K, y la posterior disminución de los niveles de PI(3,4,5)P₃ en la membrana.

ii. Bucle de retroalimentación negativo

Un mecanismo de regulación de la ruta de PI3K ocurre de manera intrínseca tras la activación de los diferentes efectores. La proteína p70S6K es capaz de fosforilar al adaptador IRS-1 (del inglés *Insuline-receptor substrate 1*), que media en la unión entre receptores tirosina quinasa y PI3K. Esto provoca un cambio conformacional en la estructura del IRS-1 que desestabiliza su unión con la enzima PI3K, provocando que finalmente se pierda la interacción entre ambas y, por consiguiente, se inactive la ruta de

PI3K [49,50]. Este mecanismo de regulación de la ruta de PI3K se conoce como bucle de retroalimentación negativo o “*negative feedback*” (**Figura 4**).

Dada la importancia de la ruta de PI3K, las células han desarrollado múltiples mecanismos de regulación adicionales, que permitan tener un adecuado control de los niveles de activación y evitan un aumento descontrolado de los niveles de PI(3,4,5)P₃, y la consiguiente inducción de supervivencia y proliferación celular. Para regular los niveles de activación de PI3K, aparte de los mecanismos mediados por PTEN y el *feedback* negativo, se ha descrito la implicación en los procesos de activación/represión de distintas rutas de señalización que también participan en la modulación de PI3K.

iii. Señalización entre las rutas PI3K y MAPK

Existe un mecanismo de regulación cruzada (*cross-talk*) entre las rutas de señalización de PI3K/Akt y de las MAP quinasas (MAPK) [51,52]. La ruta de MAPK/Erk, tras su activación, puede regular de manera positiva la ruta de PI3K en varios puntos: de manera indirecta, regulando la activación del complejo mTORC1 a través de la inhibición del complejo TSC2/TSC1, o de manera directa en el propio complejo mTORC1, fosforilando la proteína PRAS40. Por su parte, la ruta de PI3K, tras su activación, también es capaz de actuar como represora de la ruta de MAPK, inhibiendo la activación de la proteína Raf, que modula la activación de los siguientes efectores de la ruta [53] (**Figura 5**).

Estas rutas cruzadas de activación/represión demuestran la necesidad de tener varios mecanismos de control sobre la activación de la ruta PI3K, ya que cualquier posible desregulación conduciría a un aumento del metabolismo y de la proliferación celular, fomentando el desarrollo tumoral.

3.- PI3K y cáncer

3.1. Mutaciones de la ruta de PI3K en cáncer

La alteración de la ruta de PI3K es la causa de varias enfermedades entre las que se encuentra el cáncer, algunas enfermedades inmunológicas o cardiovasculares, y la diabetes. En el caso del cáncer, se han descrito un gran número de tipos asociados con modificaciones de alguna de las proteínas implicadas a lo largo de la ruta de PI3K [15] Varios estudios han descrito mutaciones específicas que provocan una activación de la ruta de PI3K, ya sea en la propia enzima, o en otras proteínas implicadas en la regulación

de su actividad, como K-Ras o PTEN [54,55]. Más concretamente, en referencia a la enzima PI3K de clase IA, se han descrito mutaciones en los genes PIK3CA, PIK3R1 Y PIK3R2[56–58]. Las mutaciones en el gen PIK3CA, que codifican para la subunidad p110 α , provocan una activación constitutiva de la enzima PI3K, haciendo ineficaces los diferentes mecanismos de regulación de la ruta [56]. En cuanto a las mutaciones del gen PIK3R1, que codifica la proteína p85 α , hay datos que demuestran que se encuentra frecuentemente mutado en el cáncer de endometrio y de colon [57,59].

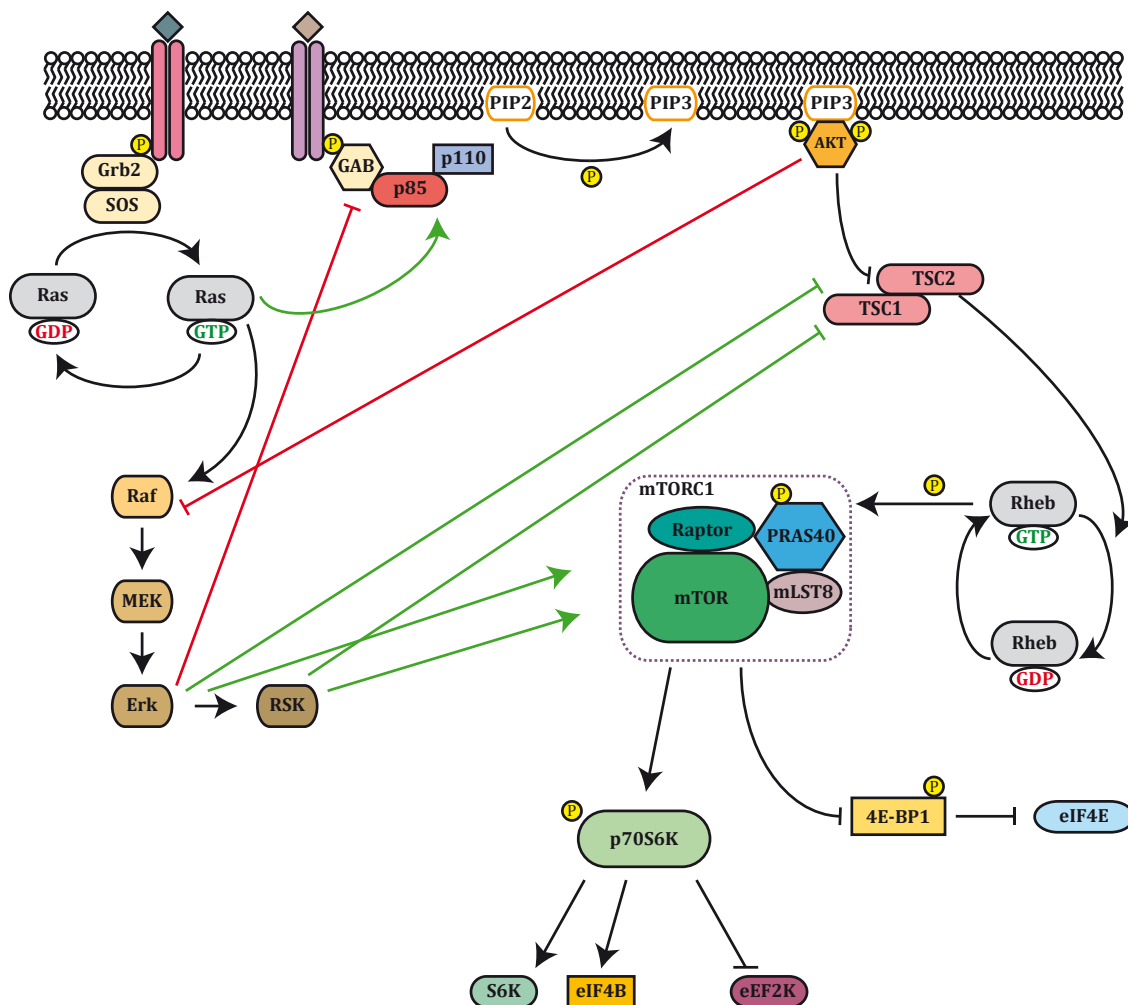


Figura 5.- Señalización cruzada (“Cross-talk”) entre las rutas de señalización de PI3K y MAPK. La regulación positiva entre ambas rutas de señalización se indica mediante flechas. La regulación negativa se indica mediante una línea roma. Las regulaciones cruzadas que provoquen la activación de una vía se indican en verde. Las regulaciones cruzadas que provoquen la inhibición de una vía se indican en rojo. Adaptado de Mendoza MC, 2011.

Recientemente se han descrito casos de mutaciones específicas en el gen PIK3R2 (p85 β) relacionadas con megaencefalopatías [58,60,61] . En el caso de las mutaciones en la enzima PTEN, se han descrito varios residuos en los que se concentran mutaciones (Arg130, Arg173 y Arg233)[55], las cuales se traducen en proteínas truncadas o con su actividad fosfatasa alterada, lo que provoca un desajuste en el equilibrio PI(4,5)P₂-PI(3,4,5)P₃ en la membrana plasmática, con unos niveles elevados de PI(3,4,5)P₃ y una activación permanente de la ruta de PI3K. En cuanto a la mutación en la proteína K-Ras, ésta provoca la activación de manera constitutiva de las rutas de MAPK y PI3K, ya que K-Ras media en la activación de ambas [27].

La implicación de las diferentes mutaciones o alteraciones de la ruta de PI3K se ha demostrado en varios tipos de cáncer, además de otras enfermedades como las megaencefalopatías. Los avances tecnológicos han permitido la secuenciación masiva de miles de muestras, y la obtención de perfiles de mutaciones que se relacionan con enfermedades específicas. Sin embargo, hay un importante número de enfermedades, en las cuales o bien no ha sido descrita ninguna mutación conductora, o bien las mutaciones detectadas no han sido estudiadas lo suficiente como para desarrollar un tratamiento concreto contra esa diana. Este conjunto de enfermedades sin una diana terapéutica confirmada se traduce en un alto número de pacientes sin un tratamiento dirigido.

3.2. Uso de inhibidores de la ruta de PI3K en la clínica

Uno de los recursos utilizados en la práctica clínica es el uso de diferentes inhibidores dirigidos contra PI3K, Akt o mTORC1. Actualmente, hay una serie de inhibidores aprobados por la FDA para su uso en diferentes enfermedades: el Idelalisib (inhibidor de p110 δ , en leucemia y dos tipos de linfomas) [62], Temsirolimus (inhibidor de mTOR, en carcinoma de células renales) [63], Impavido/Miltefosine (inhibidor de Akt, en leishmaniasis) [64], Everolimus (inhibidor de mTOR, en cáncer de mama avanzado, en tumor neuroendocrino pancreático, en cáncer renal y tuberoesclerosis) [65] y Ridaforolimus (inhibidor de mTOR, en sarcoma) [66]. Además hay muchos otros inhibidores que se encuentran en las diferentes fases de los ensayos clínicos [67,68].

El principal problema encontrado tras la utilización de los inhibidores de PI3K es su incapacidad para bloquear de manera eficaz la ruta de señalización a largo plazo. Cuando se bloquea la ruta con inhibidores específicos contra la enzima PI3K, se

interrumpe la cascada de señalización pero, a su vez, también se ven alterados los mecanismos reguladores negativos de la ruta, lo que conduce frecuentemente a una reactivación de la ruta de PI3K [69,70]. De modo similar, el uso de inhibidores de Akt o mTOR provocan el bloqueo de los mecanismos de *feedback* negativo (**Figura 6**)[50].

En concreto, cuando se utilizan inhibidores del complejo mTORC1, como la rapamicina, se inhibe la señal de activación de la ruta, y a su vez se interrumpe la fosforilación del adaptador celular IRS-1. La interrupción del *feedback* negativo provoca que se mantenga el heterodímero p110-p85 unido a los receptores de membrana, y continúen en estado activo, generando mayores cantidades de PI(3,4,5)P₃ en la membrana, lo que favorece que la ruta de señalización de PI3K se active durante más tiempo. Por otra parte, con el uso de inhibidores dirigidos contra Akt, se interrumpe la señalización antes del complejo mTORC1, además de inhibir la fosforilación de otros efectores de Akt [50]. Uno de los efectores de Akt son los factores de transcripción FOXO (del inglés *Forkhead box O-class*), los cuales, tras ser fosforilados, son trasladados al citosol, y acaban siendo ubiquitinados y degradados [71]. La inhibición de Akt permite que los factores FOXO se mantengan en el núcleo y puedan unirse a diferentes promotores génicos, promoviendo la expresión de nuevos receptores de membrana y favoreciendo que se mantenga la activación de la ruta de PI3K. Actualmente también están en estudio una segunda generación de inhibidores duales de mTOR y PI3K [72,73].

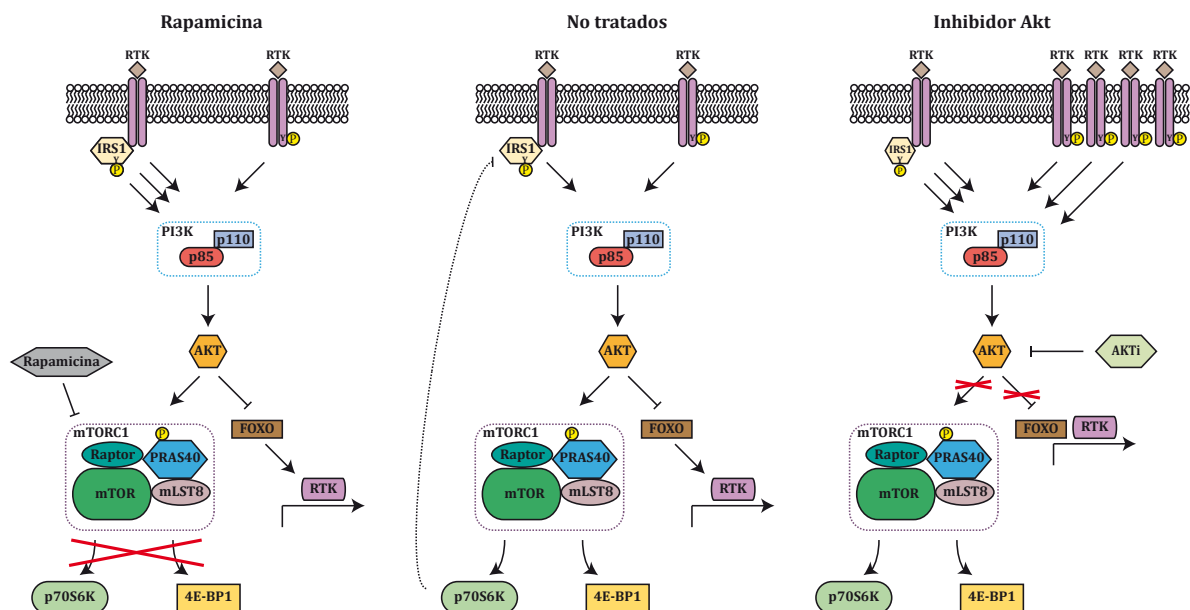


Figura 6.- Efecto de diferentes tipos de inhibidores en la ruta de PI3K. Adaptado de Chandarlapaty S, 2011 .

Los inhibidores de p110 han demostrado tener un mayor potencial antitumoral que los inhibidores de Akt en ciertos tipos de tumores [74]. A pesar de que la inhibición de una de las isoformas de p110 provoca que aparezca, de igual manera, una reactivación de la ruta de PI3K [75], el uso combinado de inhibidores para las isoformas p110 α y p110 β ha conseguido, en algunos casos, obtener mejores resultados [76].

3.3. Variación de los niveles de expresión de p85 α y p85 β (Isoform switch)

En estudios previos se han analizado los niveles de expresión de las subunidades reguladoras p85 α y p85 β en muestras tumorales de cáncer de mama y de colon, en comparación con tejido sano adyacente a las muestras tumorales. Las muestras tumorales presentaban un aumento de los niveles de expresión de p85 β , a la vez que se producía un descenso en los niveles de p85 α (al contrario de lo que sucede en las células sanas, donde la isoforma mayoritaria es p85 α). Esta variación en los niveles de expresión de ambas isoformas (*isoform switch*), se correlaciona con un aumento en los niveles de activación de la ruta de PI3K [77]. En concreto, en el caso de las muestras de cáncer de mama, se observó una correlación directa de las muestras de los pacientes que

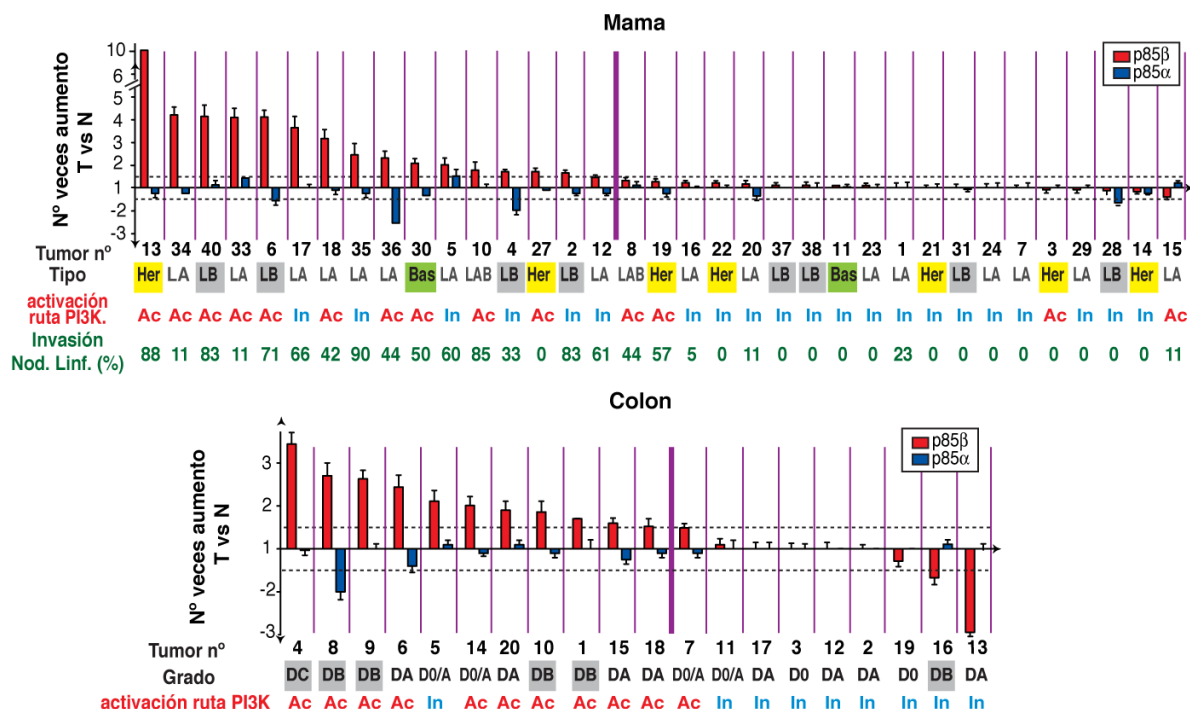


Figura 7.- Mayor expresión de p85 β en cáncer de mama y colon. T = Tumor; N = Tejido normal adyacente; Nod. Linf. = Nódulos Linfáticos. Tipos de cáncer de Mama: Her = HER2-positivo; LA = luminal A; LB = Luminal B; Bas = Basal. Estado de activación de la ruta de PI3K: Ac =Activo, In = Inactivo. Grados de cáncer de Colon (Clasificación de Dukes): D0 = 0; D0/A = 1,5; DA = 1; DB = 2; DC = 3. Línea vertical gruesa separa tumores con aumento de expresión mayor de 1,5 veces. Adaptado de Cortés I, 2012.

tenían los mayores niveles de expresión de p85 β con un mayor porcentaje de invasión de los nódulos linfáticos, siendo éste un indicador de progresión tumoral y posible desarrollo de metástasis (**Figura 7**).

Por otra parte, en el estudio con muestras de cáncer de colon, se comprobó que más del 50% de las muestras tenían una relación de expresión de p85 β respecto a p85 α mayor de 1,5; el mayor ratio entre p85 β y p85 α correlacionaba con un mayor grado de dediferenciación de los tumores, que es un indicador de mala prognosis, y que también apunta a una mayor posibilidad de desarrollo de metástasis [78].

Los estudios realizados *in vivo* con ratones *knock-out* para la subunidad reguladora p85 β demostraron que, tras el uso de azoximetano (AOM), que causa la aparición de tumores en el colon, en los ratones control aparecían un mayor número de tumores en comparación con los ratones deficientes en *pik3r2*, aunque el tamaño de los tumores fuera parecido en ambos grupos (**Figura 8A**). En otro modelo, en este caso de linfoma tímico, se trasplantó médula ósea de animales que sobreexpresaban p85 β , y se provocó un linfoma con N-etil-N-nitrosourea (ENU). En este caso, el grupo de animales que recibieron el trasplante de médula ósea de células hematopoyéticas con sobreexpresión de p85 β presentaron menor supervivencia tras la generación del linfoma, además de tener más metástasis en el bazo respecto al grupo control (**Figura 8B**) [77].

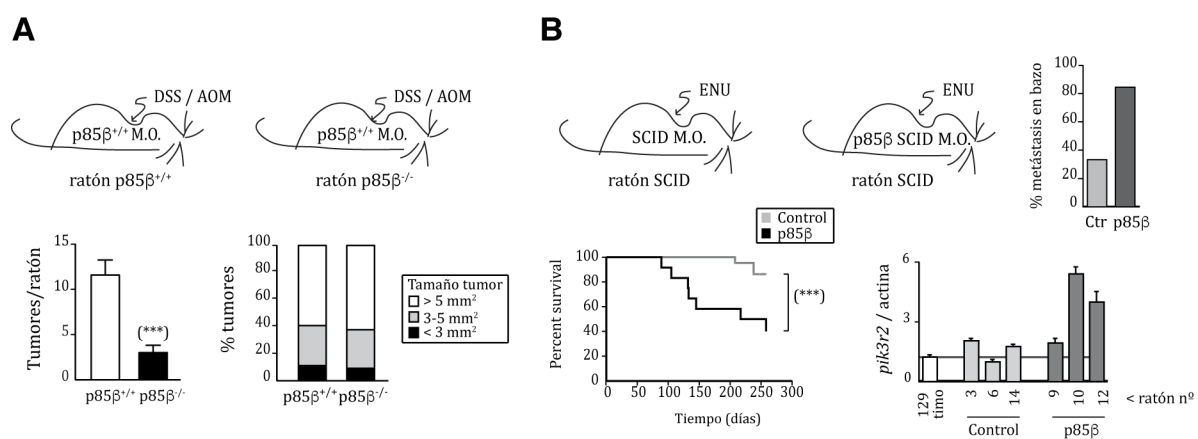


Figura 8.- Modelos de p85 β *in vivo*. (A) Carcinoma de colon inducido por el tratamiento con DSS/AOM en ratones p85 $\beta^{+/+}$ y p85 $\beta^{-/-}$ un mes después de haber recibido un trasplante de médula ósea de ratones p85 $\beta^{+/+}$. Número de tumores representan la media \pm SD. n = 12. Para el análisis estadístico se aplicó el test t de Student, *** p < 0,001. (B) Linfomagénesis inducida en ratones *scid* tras haber recibido un trasplante de células de médula ósea infectadas con un vector vacío o un vector que codifica para sobreexpresar p85 β , seguido del tratamiento con ENU. En las curvas de supervivencia, para el análisis estadístico se aplicó el test de Kaplan-Meier, *** p < 0,001. AOM = Azoximetano, DSS = Sulfato de dextrano, ENU = N-etil-N-nitrosourea. Adaptado de Cortés I, 2012.

Las subunidades reguladoras p85 α y p85 β se expresan en todos los tejidos, con mayores niveles de expresión de p85 α respecto de la isoforma p85 β , en el caso de células normales. El *isoform switch* de p85 provoca un aumento de la activación de la ruta PI3K, que puede ser debido a las funciones específicas –y diferentes entre sí– que realizan ambas isoformas [79]. Además, p85 α y p85 β presentan diferentes localizaciones subcelulares, estando p85 α principalmente en el citosol y en membranas celulares, y p85 β en placas de adhesión y en el núcleo [36]. Estas observaciones favorecen la hipótesis de que ambas isoformas tengan funciones específicas dentro de las células.

En este trabajo se ha estudiado el papel de la proteína p85 β en la proliferación celular y la progresión tumoral en diferentes líneas celulares de cáncer de células escamosas de pulmón (SqCLC), y su posible utilización como biomarcador molecular en casos de SqCLC. Además, se han desarrollado diferentes ensayos para descubrir las consecuencias de silenciar p85 β en modelos *in vivo* en tumores SqCLC ya establecidos que presenten *isoform switch*.

OBJETIVOS

- 1.-** Estudio de los niveles de las distintas isoformas de PI3K de clase IA, y en concreto de las subunidades reguladoras p85, en líneas celulares de cáncer de células escamosas de pulmón.
- 2.-** Estudio de la implicación de p85 β en la activación de la ruta de PI3K y en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de células escamosas de pulmón.
- 3.-** Estudio del uso de agentes interferentes contra p85 β (en lugar de inhibidores de PI3K) como posible tratamiento terapéutico para tumores accesibles como es el caso en el cáncer de células escamosas de pulmón.
- 4.-** Determinación de nuevas interacciones de PI3K que expliquen las funciones específicas de p85 β .

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Líneas Celulares

Se han utilizado las siguientes líneas:

- ATCC (*American Type Culture Collection*):
 - Líneas celulares humanas de cáncer de células escamosas de pulmón: CaLu-1 (HTB-54), SK-MES-1 (HTB-58), NCI-H1869 (CRL-5900), NCI-H520 (HTB182), NCI-H2170 (CRL- 5928), NCI-H226 (CRL-5826), SW900 (ATCC HTB-59).
 - Línea celular de Adenocarcinoma de pulmón: NCI-H1703 (CRL-5889) .
 - Línea celular de Leucemia de células T: Jurkat (TIB-152).
 - Línea celular epitelial no tumorigénica: MCF-10 (CRL-10317)
 - Línea celular embrionaria de riñón: HEK-293T (CRL-3216).
 - Línea celular de riñón de mono verde: COS-7 (CRL-1651).
 - Línea celular de fibroblastos de ratón: NIH-3T3 (CRL-1658).
- DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH):
 - Líneas celulares de cáncer de células escamosas de pulmón: HCC-15 (ACC-496), EPLC-272H (ACC-383).
- Otras líneas celulares: BLM (melanoma), NCI-H2882 (cáncer de células escamosas de pulmón).

Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad.

Anticuerpos

- Western blot: p110 α (clon C73F8, #4249, CST), p110 β (C33D4, #3011, CST), p85 α (#05-212, Millipore), p85 β (1C8, [77]), β -actina (A5441, Sigma), pAkt T308 (C31E5E, #2965, CST), pAkt S473 (#9271, CST), Akt total (#9272, CST), p-p70S6K (#9205, CST), p70S6K total (sc-230, Santa Cruz), p-PRAS40 T246 (MAB68901, R&D Systems), p-Erk (#9101, CST), Erk total (#9102, CST), GST (sc-138, Santa Cruz), pFAK Y397 (#3283, CST), FAK total (610088, BD Biosciences).
- BrdU-FITC (clon B44, #347583, BD Biosciences).
- Inmunoprecipitaciones (IPs): WHIP (C) (clon C-10, sc-5147409, Santa Cruz), WHIP (N) (clon A-8, sc-376438, Santa Cruz), WHIP (N) abcam (ab99316), pan-p85 (06-195, Upstate), lamina A/C (636, sc-7292, Santa Cruz).

Bases de datos

- Oncomine (www.oncomine.org).
- The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://cancergenome.nih.gov>).
- Genecodis (<http://genecodis.cnb.csic.es>).
- Uniprot (www.uniprot.org/)

Soluciones tampón

- Solución tampón RIPA: 20 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA; 1 mM EGTA; 1% NP-40; 1% desoxicolato sódico.
- Solución tampón *Laemmli*: 150mM Tris-HCl pH 7,4; 10% SDS; 25% glicerol; 5% β-mercaptoetanol; azul de bromofenol.
- Solución tampón de lisis de *Pull Down*: 10mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 2,5mM MgCl₂; 0,5% NP-40.
- Solución tampón de lisis de IP: 10mM Tris-HCl pH 8; 150mM NaCl; 10mM KCl; 1% NP-40.
- Solución tampón de extracción de laminas: 10mM Tris-HCl pH 8; 300mM NaCl; 1% NP-40; 10mM KCl; 0,2mM PMSF.
- Solución tampón de lisis A: 10mM Hepes pH 7.9; 10mM KCl; 1.5mM MgCl₂; 0.34M Sacarosa; 10% glicerol [80].

Plásmidos

- Addgene
 - Tet-pLKO-neo fue donado por Dmitri Wiederschain (#21916, Addgene):
 - shRNA-PIK3R1.
 - shRNA-PIK3R2.
 - pMD2.G fue donado por Didier Trono (#12259, Addgene).
 - psPAX2 fue donado por Didier Trono (#12260, Addgene).
- pEBG(GST)-human_p85β fue generado en el laboratorio.
- pEBG(GST)-murine_HA-p85α fue generado en el laboratorio.
- pSG5-myc-p110β [81].
- pSG5-myc-p110α [81].

Ratones

- Todos los procedimientos realizados en esta tesis con animales están de acuerdo con la directiva de la Comunidad Europea 2010/63/EU y fueron aprobados por el comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y por la Comunidad de Madrid (PROEX 295/15).
- Para los experimentos de xenógrafos se utilizaron dos cepas de ratones procedentes de la empresa Envigo. Las cepas utilizadas fueron:
 - *scid/scid* (BALB/c)HanHsd-Prkdc^{scid}).
 - *scid/Beige* (C.B-17/ IcrHsd-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-J}).

Otros materiales

G418 (A1720, Sigma-Aldrich), Inhibidores PI3K: Ly294002 (L9908, Sigma-Aldrich), PIK75, TGX221, Rapamicina (R0395, Sigma-Aldrich), Matrigel (354234, BD), Fibronectina (F2006, Sigma-Aldrich), microesferas glutatión-sefarosa (17-0756-01, Amersham Biosciences), DNAsa (D4527, Sigma-Aldrich), Inhibidores: NaF, ácido okadaico (459620, Calbiochem), ortovanadato sódico, PMSF, Aprotinina (A1153, Sigma-Aldrich), Leupeptina (L2884, Sigma-Aldrich). Proteína L (sc-2336, Santa Cruz), Proteína A (71-7090-00 AF, GE Healthcare), Proteína G (71-7083-00 AI, GE Healthcare).

Otros reactivos de uso habitual en el laboratorio, si no se indica lo contrario, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich

Programas de análisis

- BLAST: Para comparar las secuencias de las subunidades p85 α y p85 β [82,83].
- VENNY: Para comparar los datos obtenidos en proteómica, y determinar qué proteínas se identificaron en varios complejos se utilizó el software *Venny*. El diagrama de Venny permite separar las proteínas que se identificaron de manera específica en un solo complejo, o si se encontraron en complejos con alguna subunidad en común [84].
- ImageJ, Fiji: Para realizar las cuantificaciones de los *western blot* [85,86].
- GraphPad Prism 6: Para realizar los análisis estadísticos.

Métodos

Transfección celular

Para la transfección de las diferentes líneas células se utilizaron Lipofectamina Plus (Thermo Fisher Scientific) o Jet Pei (Polyplus Transfection), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Curvas de resistencia G418

Se sembraron las diferentes líneas celulares objeto de infección, y se añadió G418 (Neomicina) a diferentes concentraciones, con el objetivo de conocer la concentración mínima que producía muerte celular en cada línea. Se determinó la concentración mínima requerida, la menor concentración que provocaba la muerte del cultivo celular tras 14 días de exposición.

Generación líneas celulares estables

Para la generación de líneas celulares estables con lentivirus hubo que producir, en primer lugar, las partículas virales que contenían los ADN que queremos expresar, y posteriormente se infectaron las células diana, resultando en la integración del plásmido de interés en el genoma de las mismas.

Se sembraron 10^6 células HEK-293T en una placa p60 y, tras 24 horas en cultivo, se realizó una co-transfección de tres plásmidos (según recomendaciones del fabricante): los plásmidos pMD2.G (contiene el inserto VsVg), Pax2 y el plásmido con el shRNA de interés (vacío, p85 α o p85 β). Los plásmidos pMD2.G y Pax2 generan las proteínas necesarias para formar la cápside de los lentivirus, mientras que el tercer vector transfectado se integra en el genoma del virus, y tras la infección en la célula diana, se expresará el shRNA que contenga.

Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo a las células, y se añadió medio de cultivo nuevo con suero (sin antibióticos). Las células producen las partículas lentivirales que posteriormente se liberan al medio. Se incubaron las células 24 horas; además, se sembraron las células que serán objeto de la infección en 2 placas p6 multi-pocillo, en los cuales se realizaron las infecciones.

Tras las 24 horas de incubación, las células HEK-293T produjeron las partículas virales, que se encontraban en el medio de cultivo. Para poder realizar la infección, se recogió el

medio de las células (se les añadió de nuevo el mismo tipo de medio a las células HEK-293T para realizar una segunda infección) que contiene las partículas virales, se filtró con un filtro de diámetro de poro de 0,45µm, y se le añadió polibreno (5 µg/mL).

Por otra parte, a las células que van a ser infectadas se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS, y se les añadió 2,5mL de medio de cultivo que contiene las partículas virales. A continuación, se centrifugaron las placas a 1500 rpm, 90 minutos, a 37°C (precipitan las partículas virales y aumenta la eficiencia de la infección). Tras la centrifugación, las placas se incubaron durante 5 horas, a 37°C y 5% CO₂. Pasadas las 5 horas, se retiró el medio de infección de las células, y se añadió a cada línea celular su medio de cultivo correspondiente.

Al día siguiente, se repitió todo el procedimiento de infección (segunda infección). 48 horas más tarde de esta nueva infección, se añadió el G418 al medio de cultivo de las células infectadas, para comenzar la selección de las células que han sido infectadas de manera efectiva, y se mantuvo durante 14 días, tras los cuales se obtienen las células resistentes para el G418.

Cuantificación *Western Blot*

La intensidad de las bandas en los *western blot* fue cuantificada utilizando los programas informáticos ImageJ y Fiji.

Ensayos de xenotrasplantes

Se utilizaron ratones de dos cepas distintas: por un lado, se utilizó la cepa *scid/scid* (BALB/c)HanHsd-Prkdc^{scid}) que no desarrolla células T ni B. También se utilizaron ratones de la cepa *scid/beige* (C.B-17/ IcrHsd-Prkdc^{scid}Lyst^{bg-l}), que no desarrollan células T ni B, y las células “*Natural Killer*” (NK) tienen una deficiencia en su capacidad citotóxica.

El día previo de la inyección se descongela el matrigel necesario, manteniéndolo a 4°C para que se encuentre en estado líquido.

El día de la inoculación, se levantaron las células, se lavaron con PBS 1X, y se pusieron en solución 1:1 con el matrigel, manteniendo la solución en hielo hasta el momento de su inyección en los ratones.

En el animalario, el primer paso fue cortar el pelo del lomo de los animales y posteriormente fueron anestesiados por vía aérea usando isoflurano. Las células se inyectaron en ambos flancos de los animales, con una jeringa de 1mL y una aguja de 19G. Se recogieron las células con la jeringa (sin aguja) y posteriormente se inyectaron $5-10 \times 10^6$ células/flanco en los animales anestesiados, en un volumen final de 200-250 μ L. Finalmente, las heridas post-inyección fueron selladas con un sellador dérmico comercial en spray.

Tras 7-10 días de las inoculaciones, se comprobó que los tumores estaban bien establecidos, momento en el cual se comenzaron los experimentos con la adición de doxiciclina (2 mg/mL) y sacarosa al 5% en el agua de los animales.

Los tumores fueron medidos con un calibre digital, midiendo en todas las ocasiones el diámetro mayor (D) y el menor (d). Posteriormente, se calculó el volumen aproximado de cada tumor con la fórmula:

$$Volumen\ final = \frac{D * d^2}{2}$$

Los animales fueron pesados y examinados 2-3 veces/semana, asegurando el buen estado de los animales en todo momento, y confirmando cada vez que no sobrepasaban ningún criterio de punto final del experimento (pérdida del 20% del peso inicial, volumen del tumor mayor de 1500 mm³ o pérdida completa del tumor durante dos semanas).

Ensayo de activación de la proteína FAK a través de integrinas

Se sembraron las diferentes líneas celulares, y fueron tratadas 72 horas con doxiciclina a una concentración de 5 mg/mL. Tras las 72 horas, se lavaron las diferentes placas con PBS, y se añadió medio de cultivo sin suero (*starving*) y doxiciclina a la misma concentración, y se incubaron un mínimo de 16 horas; a su vez se prepararon 2 placas de 6 pocillos tapizadas con fibronectina (15 mg/mL).

Al día siguiente, se lavaron las células con PBS, y se levantaron con EDTA 0,02%. A continuación, se sembraron las células en diferentes condiciones: sin fibronectina, con fibronectina sin suero (a dos tiempos distintos, 20 y 60 minutos respectivamente), y con fibronectina con suero (también a 20 y 60 minutos).

Tras los diferentes tratamientos, se recogieron las células y se obtuvieron extractos celulares en solución RIPA con inhibidores.

Ensayo de precipitación de proteínas con microesferas de agarosa

Las células COS-7 se transfectaron con diferentes plásmidos (pEBG(GST)-human_p85 β , pEBG(GST)-murine_HA-p85 α , pSG5-myc-p110 β o pSG5-myc-p110 α) en distintas combinaciones. Tras 48 horas desde la transfección, se levantaron las células y fueron lisadas con un tampón de lisis para *Pull Down* durante 60 minutos, en rotación a 4°C. Tras la cuantificación de proteínas de cada condición, se realizó un *Pull Down* (PD) utilizando 4mg en el PD1, 8mg en PD2, por condición y 500 μ L de microesferas (*beads*) de sefarosa con glutatión. Se pusieron en rotación 90 minutos a 4°C, y posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm, 5 minutos, para retirar el sobrenadante. El complejo de proteínas formado en las *beads* fue lavado 3 veces con la solución de lisis, y dos veces con la solución de lavado, y finalmente se les añadió 100 μ L de solución de carga; se hirvieron 10 minutos, y se congelaron las muestras a -20°C, para entregarlas en el Servicio de Proteómica del CNB.

Espectrometría de masas Triple-TOF

En primer lugar, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para resolver las proteínas de las muestras; a continuación, se tiñó el gel con azul coomassie coloidal, y se recortaron las bandas de cada carril de cada muestra para ser digeridos con tripsina. Posteriormente, cada muestra digerida fue fraccionada por cromatografía reversa a pH básico. Finalmente, se realizó una cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas *triple-TOF*. Los datos obtenidos fueron analizados en el motor de búsqueda MASCOT frente a la base de datos de *Homo sapiens* de UNIPROT.

Ensayo de pulso y caza de bromodesoxiuridina (BrdU)

El día anterior al ensayo se sembraron $0,5 \times 10^6$ células en placas p100, una placa por cada condición deseada. Al día siguiente, se añadió el BrdU 1/500 (stock = 10 mM) en cada placa y se incubó a 37°C durante el tiempo del pulso (dependiendo de cada línea celular, entre 30 y 90 minutos). Tras el pulso de BrdU, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las placas con PBS, y se les añadió medio de cultivo fresco sin BrdU. Se recogieron los diferentes tiempos (caza) según el siguiente procedimiento: se lavó la

placa con PBS, se levantaron las células con EDTA 0,02% y tras centrifugar 5 minutos a 1200 rpm y eliminar el sobrenadante (SN), las células se resuspendieron en PBS frío (4°C) durante 5 minutos. Tras los 5 minutos, se centrifugaron las células, se eliminó el SN, y se resuspendieron en 100µL de PBS frío, tras lo cual se añadió -gota a gota- 5mL de etanol frío (-20°C), y se incubaron las células toda la noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, se descartó el SN y se resuspendieron en 150mL de PBS frío. Las células resuspendidas se pasaron a una placa multipocillo de fondo en V. Se centrifugó la placa a 800 rpm, 5 minutos, y se descartó el SN; a continuación se añadieron 200µL de una solución HCl 2M : 0,5% Tritón X100 : Pepsina (1:1000, stock = 20mg/mL), y se incubaron las células en primer lugar 30 minutos a temperatura ambiente (RT), y después 12 minutos a 37°C. Tras estas incubaciones, se centrifugaron las células a 800 rpm, se descartó el SN y se lavaron las células con una solución de PBS más 5% de FBS. Tras el lavado, se añadió a cada punto 12µL del anticuerpo anti-BrdU conjugado con FITC en un volumen total de 100µL de una solución compuesta de PBS 1X : 5% FBS : 0,5% Tritón X100, y se incubaron las células durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Tras la incubación, se lavaron las células con PBS 1X un par de veces, y finalmente se resuspendieron en 1mL de una solución 1:1 de PBS y Ioduro de propidio (PI), se incubaron 30 minutos a 37°C (en oscuridad) y fueron guardadas a 4°C, hasta que se analizaron en el citómetro de flujo.

Ensayo de fraccionamiento celular

Partiendo de células vivas no fijadas, se levantaron las células y se resuspendieron en solución tampón de lisis A (*10mM Hepes pH 7.9; 10mM KCl; 1.5mM MgCl₂; 0.34M Sacarosa; 10% glicerol*) + 1µM DTT + inhibidores de proteasas + 0,1% Tritón X100 y se incubaron 5 minutos en hielo. Se centrifugaron 5 minutos a 3500 rpm y a 4°C, y se recogió el sobrenadante, que consiste en la fracción citosólica. El pellet formado son los núcleos intactos, los cuales fueron lavados con el buffer A + 1µM DTT (igual volumen que paso anterior). Se centrifugaron en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante, y se obtuvieron los núcleos intactos [80].

Ensayo de inmunoprecipitación (IP)

Partiendo de varias placas p150 de células U2Os en crecimiento exponencial, se levantaron las células con EDTA 0,02%, y se lisaron con según el protocolo de fraccionamiento celular. Tras obtener los núcleos lavados, éstos fueron lisados con el tampón de lisis de inmunoprecipitación (30 minutos en rotación a 4°C), después se añadió DNAsa, y se incubó en rotación durante 90 minutos a RT.

Se llevó a cabo una cuantificación de proteína (Micro BCA Kit –Pierce-), y se utilizó 1 mg proteína total/IP, y se añadieron los anticuerpos para las IPs (3 horas en rotación, a 4°C). A continuación se añadieron las microesferas de sefarosa unidas a proteína A, G o L (dependiendo del anticuerpo utilizado) y se incubaron durante 1 hora más a 4°C.

Tras las incubaciones, se centrifugaron las IPs a 800rpm y 4°C, y se recogieron los sobrenadantes (que comprenden la fracción no inmunoprecipitada), que fueron descartadas. Las microesferas, que contienen el complejo inmunoprecipitado, se lavaron 2 veces con el tampón de lisis de IP, y 4 veces con el tampón de lisis de IP sin NP-40. Finalmente, se añadió 15 µL de solución de carga (*Laemmli buffer*) a cada IP y se hirvieron las muestras durante 10 minutos.

Las inmunoprecipitaciones fueron resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se llevó a cabo una inmunodetección por *western blot* (WB).

RESULTADOS

1.- Niveles de p85 β en diferentes tipos de cáncer de pulmón

La importancia de PI3K en cáncer está en la actualidad bien demostrada. Estudios previos del laboratorio mostraron que la sobreexpresión de p85 β induce la activación de la ruta de PI3K. Existe una sobreexpresión de p85 β en el cáncer de mama y de colon con respecto a los correspondientes tejidos sanos [77]. Para averiguar si hay más tipos de cáncer con estas características, se realizó un estudio de la expresión génica de *PIK3R2* (que codifica la proteína p85 β). Para ello, se utilizó la base de datos online *Oncomine*, que recopila datos de diferentes microarrays realizados con muestras de pacientes de cáncer, y se comparó la señal correspondiente al ARN mensajero (ARNm) del gen *PIK3R2*. En relación con el cáncer de pulmón, en *Oncomine* se encontraron tres estudios distintos que mostraban que el nivel de ARNm del gen *PIK3R2* era significativamente mayor en el cáncer de células escamosas de pulmón (SqCLC, del inglés *Squamous Cell Lung Carcinoma*) (**Figura 9**) [87].

De este análisis se concluyó que el cáncer de células escamosas de pulmón es un buen candidato para estudiar si existe una relación directa entre la expresión de la subunidad reguladora p85 β y el crecimiento o progresión de este tipo de cáncer.

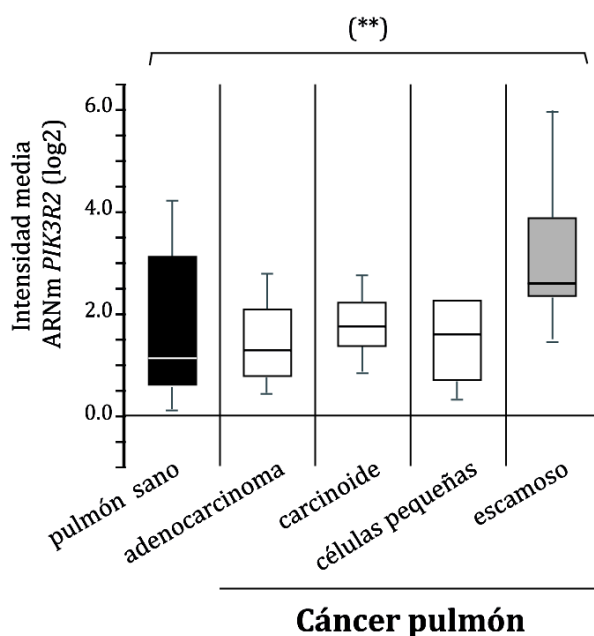


Figura 9.- El cáncer de células escamosas de pulmón (SqCLC) tiene mayores niveles de ARNm del gen *PIK3R2*. Estudio de *microarrays* de muestras de pacientes con diferentes tipos de cáncer de pulmón diagnosticados, obtenidos de la base de datos online *Oncomine*. Los datos se representan en diagramas de cajas. El gráfico muestra la media \pm SD. Para el análisis estadístico se aplicó el test t de Student, ** $p < 0,01$.

2.- Análisis de los niveles de PI3K en distintas líneas celulares de cáncer de células escamosas de pulmón

2.1. Determinación de los niveles de expresión de p85 β y p85 α en SqCLC

Los datos procedentes de la base de datos *Oncomine* soportaban el enfoque de la investigación hacia el estudio del papel de la enzima PI3K, y en concreto de p85 β , en el cáncer de células escamosas de pulmón (SqCLC). En primer lugar, buscamos un panel de líneas celulares de tipo SqCLC en diferentes repositorios y colecciones de líneas celulares: “*American Type of Cell Culture*” (ATCC) y “*Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*” (DSMZ).

A continuación, se analizaron los niveles de expresión de las isoformas de las distintas subunidades de PI3K de clase IA en estas líneas de SqCLC. Para ello, se utilizó como control la línea celular Jurkat (línea celular de linfocitos T humanos inmortalizados), que tiene los niveles de expresión de p85 β y p85 α similares [88], y puede ser usada para normalizar los niveles relativos de p85 β y p85 α , en distintos experimentos, tomando el valor de expresión de p85 β o p85 α en Jurkat como 1 y refiriendo a este valor los niveles de p85 β y p85 α de las distintas líneas celulares. Realizamos un análisis de un total de 10 líneas SqCLC, además de una línea de adenocarcinoma de pulmón (H1703). Como controles adicionales utilizamos las células MCF10 (línea de células epiteliales normales), que tiene mayores niveles de expresión de p85 α que de p85 β , y BLM (línea celular de melanoma), la cual expresa mayoritariamente p85 β .

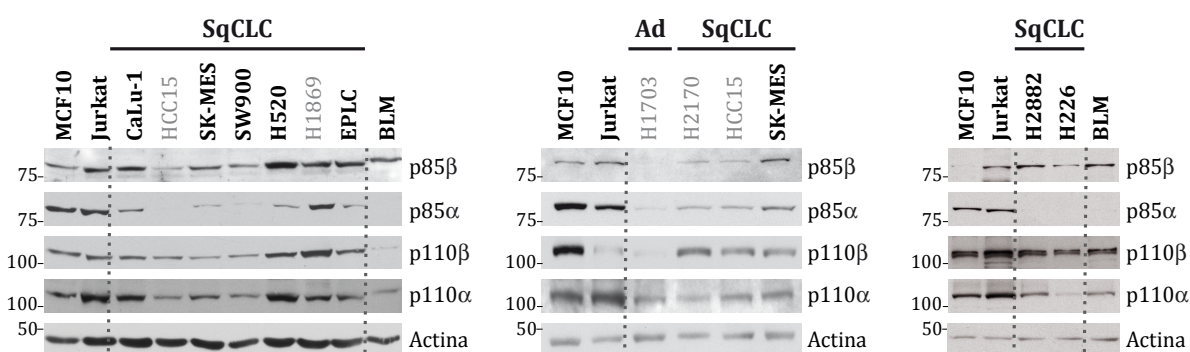


Figura 10.- Las líneas de SqCLC tienen mayores niveles de expresión de p85 β que de p85 α . Determinación de los niveles de expresión de las isoformas principales de las diferentes subunidades de la enzima PI3K de clase IA. Se analizaron 10 líneas celulares de SqCLC y una línea celular de adenocarcinoma pulmonar (H1703). Se utilizaron como líneas celulares control BLM, MCF-10 y Jurkat. SqCLC = Cáncer de células escamosas de pulmón; Ad = Adenocarcinoma. (n = 3).

Se recogieron las células procedentes de cultivos celulares en crecimiento exponencial y se lisaron con una solución tampón de lisis denominada RIPA junto con diversos inhibidores. Se normalizó el contenido de proteína en los distintos lisados celulares y se analizaron por *Western Blot* (WB) (**Figura 10**).

Este análisis demostró que las líneas celulares SqCLC presentan mayores niveles de p85 β que de p85 α , mientras que los niveles de las isoformas de la subunidad catalítica p110 (p110 α y p110 β), tienen diferentes valores en cada línea celular.

2.2. Determinación del ratio p85 β /p85 α en SqCLC

En primer lugar se realizó una estratificación de las líneas celulares en base a sus niveles totales de expresión de p85 β (**Figura 11A**). Dado que los heterodímeros de p85 β /p110 α presentan mayor actividad PI3K basal que los heterodímeros p85 α /p110 α [77], es importante determinar la relación entre un tipo de complejo y otro. Para ello se calculó el ratio entre p85 β y p85 α (**figura 11B**). A partir de este punto, nos referiremos a las líneas clasificadas de acuerdo con los valores de la relación entre p85 β / p85 α .

En conjunto, estos datos muestran que las 10 líneas celulares SqCLC analizadas tienen mayores niveles de expresión de p85 β en comparación con p85 α , aunque el ratio de expresión p85 β /p85 α es variable. Los datos también muestran una expresión variable, a nivel de cada línea celular, de las isoformas principales de la subunidad catalítica p110 (**Figura 10**).

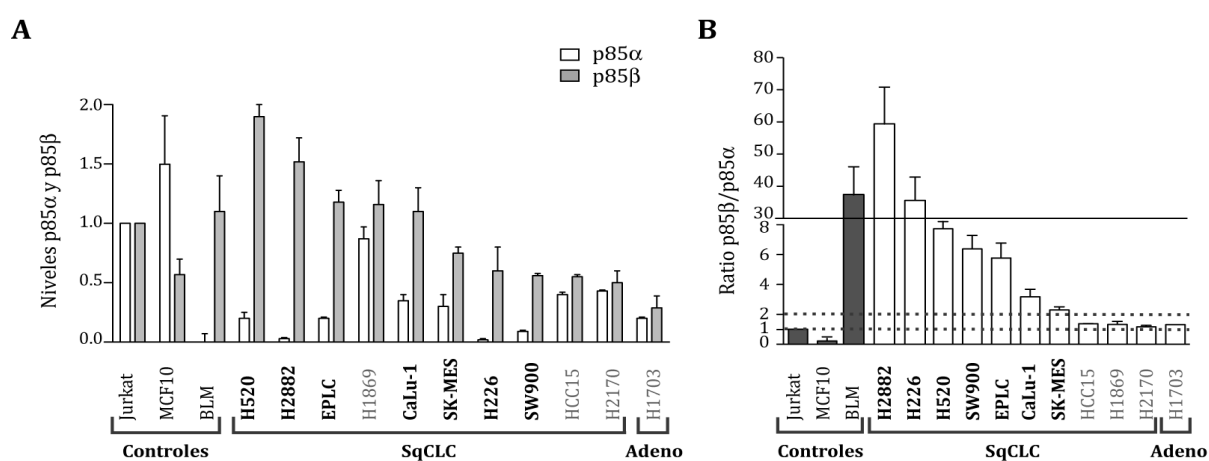


Figura 11.- Las líneas de SqCLC tienen mayores niveles de p85 β y distintos ratios p85 β /p85 α . (A) Determinación de los niveles absolutos de p85 α y p85 β , utilizando como valor 1 los niveles de ambas isoformas en células Jurkat. (B) Estudio comparativo del ratio p85 β /p85 α en las diferentes líneas celulares SqCLC. Las líneas celulares cuyos nombres están en gris son aquellas con un ratio p85 β /p85 α menor de 2. El gráfico muestra la media \pm SEM. SqCLC = Cáncer de células escamosas de pulmón; Ad = Adenocarcinoma. (n = 3).

3.- Estudio *in vitro* de la activación de la ruta de PI3K en líneas SqCLC tras reducir los niveles de p85 α o p85 β

Para el estudio de la activación de la ruta canónica de PI3K, se analizaron los niveles de fosforilación de distintos efectores esta ruta, que se correlacionan con un estado activo de los mismos. Los efectores estudiados fueron Akt, también llamada proteína quinasa B (PKB), analizando dos fosforilaciones que determinan su estado de activación (Thr308 y Ser473) [89]; PRAS40, determinando la fosforilación en el residuo Thr246 [90]; y p70S6K, midiendo la fosforilación del residuo Thr389 [91]. También se estudió el grado de activación de la proteína Erk, como control de la ruta de señalización de las MAPK, ya que podría existir una regulación mutua entre PI3K y Erk [53].

El estudio de la fosforilación de estos efectores se realizó utilizando cultivos celulares asincrónicos en crecimiento exponencial, así como cultivos incubados sin suero durante 16 horas (*starving*), lo que permitió “silenciar” las rutas de señalización celular y obtener una activación óptima y sincrónica tras la adición de suero. Se comparó la activación de los efectores a 30 ó 60 minutos tras la re-estimulación con suero. Esta cinética permitió comparar si hay una activación normal de la ruta de PI3K a corto/medio tiempo, o si por el contrario, hay algún retraso en la activación de la ruta en alguno de los distintos puntos.

Para este estudio se seleccionaron 2 líneas celulares de SqCLC. Para contemplar diferentes escenarios, se decidió trabajar con una línea celular con un ratio de p85 β /p85 α elevado (H226 ratio >10), y otra con un ratio más bajo (CaLu-1 ratio ~3).

Con el fin de determinar la implicación de p85 β en la activación de la ruta de PI3K en SqCLC, se generaron en el laboratorio nuevas líneas celulares estables a partir de éstas, que contienen un vector lentiviral que expresa un shRNA (del inglés *short hairpin RNA*) inducible por doxiciclina, capaz de silenciar la expresión del gen diana del shRNA [92]. De cada línea celular se generaron líneas que expresaban el vector vacío (usado como control), o un shRNA para *PIK3R2* (p85 β) o para *PIK3R1* (p85 α).

La reducción de los niveles de expresión de las diferentes isoformas de p85 se produce tras inducir 72 horas la expresión del shRNA con doxiciclina. Tras este periodo, se comprobó los niveles de expresión de p85 β en ambas líneas celulares estables (CaLu-1 shRNA-*PIK3R2*, H226 shRNA-*PIK3R2* y sus respectivas líneas controles). El

silenciamiento de p85 β fue correcto en ambos casos (mayor del 90%) y se analizó el estado de activación de la ruta de PI3K, determinando los niveles de fosforilación de Akt, p70S6K, PRAS40 y Erk.

Con objeto de cuantificar estos resultados y comparar distintos experimentos se procedió a medir la intensidad de la señal correspondiente a los distintos efectores en los resultados de *WB* utilizando el programa *ImageJ*. La señal se normalizó, en cada caso, respecto a la señal correspondiente al contenido de la proteína total en cuestión. La ruta de PI3K tiene una rápida cinética de activación, por lo que se decidió darle un valor de 100% a los resultados obtenidos tras 30 minutos de re-estimulación, ya que era a este tiempo cuando se detectaban los mayores niveles de fosforilación y, por tanto, activación de Akt.

La línea H226 expresa principalmente la isoforma p85 β , por lo que, tras silenciar ésta isoforma, y dado el papel de la subunidad reguladora en la estabilización de p110 [26], se produce una ligera disminución en los niveles de ambas isoformas de la subunidad

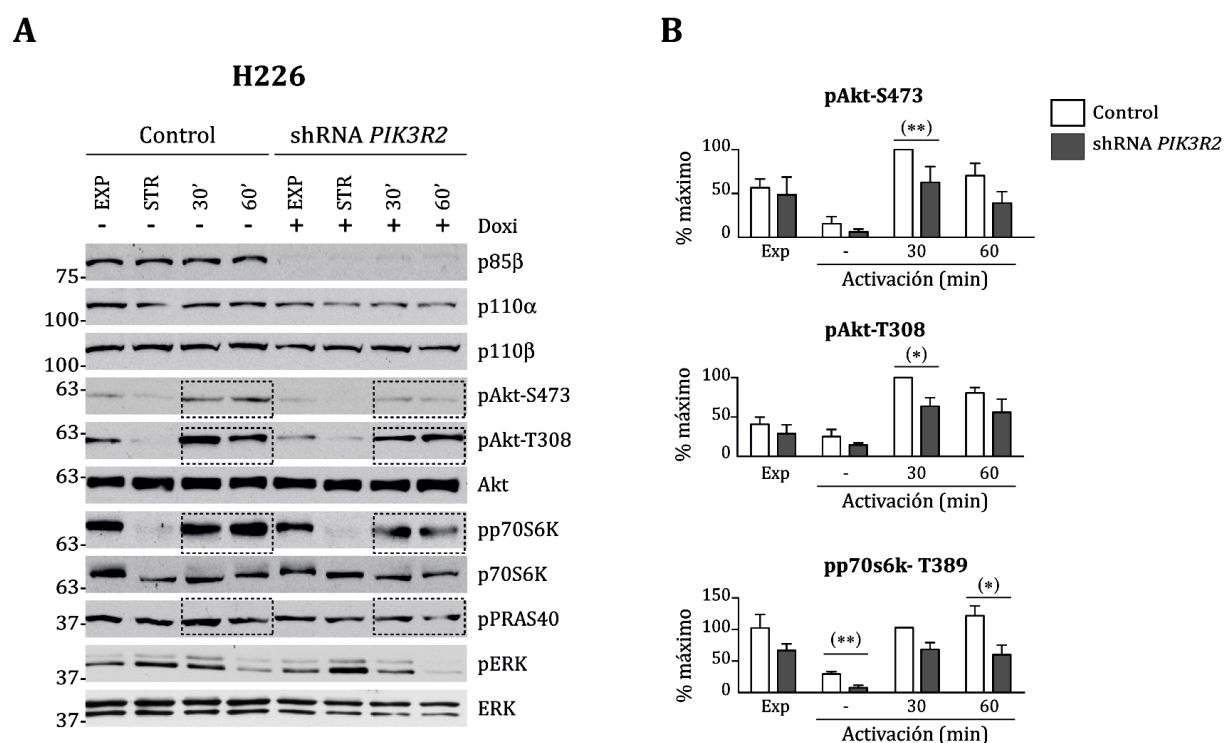


Figura 12.- El silenciamiento de p85 β en H226 reduce la actividad de la ruta PI3K. Las células H226 se cultivaron con doxiciclina (2 mg/mL, 72h). Se analizaron las células en crecimiento exponencial (EXP), tras 16 horas de *starving* (STR), o tras el *starving* y la posterior re-estimulación durante 30 ó 60 minutos (30', 60'). (A) WB representativo de cada proteína analizada (B) Cuantificación de los experimentos. El gráfico muestra la media \pm SD. Para el análisis estadístico se aplicó el test t de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (n = 3).

catalítica p110. Esto explicaría que, en la línea celular H226-shRNA-*PIK3R2*, se observase un menor grado de activación de la ruta de señalización canónica de PI3K en los diferentes efectores estudiados. En concreto, comparando los niveles de fosforilación entre la línea control (shRNA vacío) y la línea con p85 β reducido, se observó que había una menor señal de Akt fosforilado en los residuos Thr308 y Ser473 a 30 minutos tras la re-estimulación con suero, y un menor nivel de fosforilación de p70S6K en el residuo Thr389 (tanto tras las 16 horas de privación de suero, como a 60 minutos tras re-estimulación). La proteína PRAS40, que forma parte del complejo mTORC1, también tiene una ligera reducción en los niveles de fosforilación de la Thr246, si bien esta diferencia no es significativa, al igual que la variación en los niveles de fosforilación de Erk1/2 (Thr202/Thr204) (**Figura 12**). En el caso de la línea celular CaLu-1, tras el tratamiento con doxiciclina, se determinó que, en el caso de Akt, hay una reducción en el nivel de activación en el tiempo de 60 minutos tras la re-estimulación, detectada en ambas fosforilaciones (Thr308 y Ser473). En el caso de p70S6K, se observó la misma disminución en la activación a 60 minutos tras la re-estimulación, y también en la condición de crecimiento exponencial (**Figura 13**). Este último resultado tiene una especial importancia, ya que la línea celular CaLu-1 posee una mutación en el gen *KRAS* [93], que provoca una activación constitutiva de la proteína y, en consecuencia, de las rutas PI3K/Akt y MAPK/Erk [53]. También a 60 minutos tras la re-estimulación se pudo observar un ligero descenso en los niveles de PRAS40 fosforilado, mientras que no se observaron cambios en los niveles de fosforilación de Erk1/2 en los distintos tiempos analizados. La disminución del nivel de activación de p70S6K y el hecho de que no haya cambios significativos en la activación de Erk sugieren que, a pesar de que las células CaLu-1 posean la mutación de *KRAS*, no hay una compensación en la ruta MAPK/Erk tras inhibir PI3K.

Esta disminución de los niveles de fosforilación observadas tanto en Akt como en p70S6K (y en menor grado también en PRAS40) tras la reducción de p85 β , confirman la implicación de la subunidad reguladora p85 β en el estado de activación de la ruta de señalización de PI3K/Akt en SqCLC.

Para corroborar que p85 β es la principal isoforma implicada en la activación de la ruta de PI3K y no p85 α , se repitió el estudio *in vitro* tanto en CaLu-1 como en H226, con

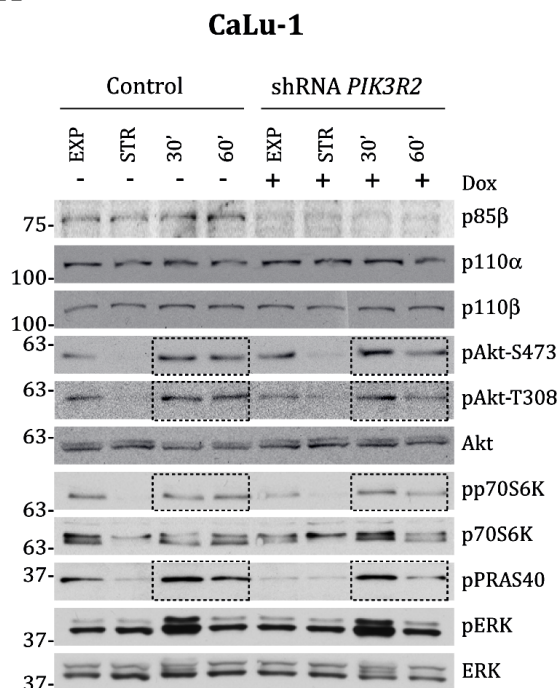
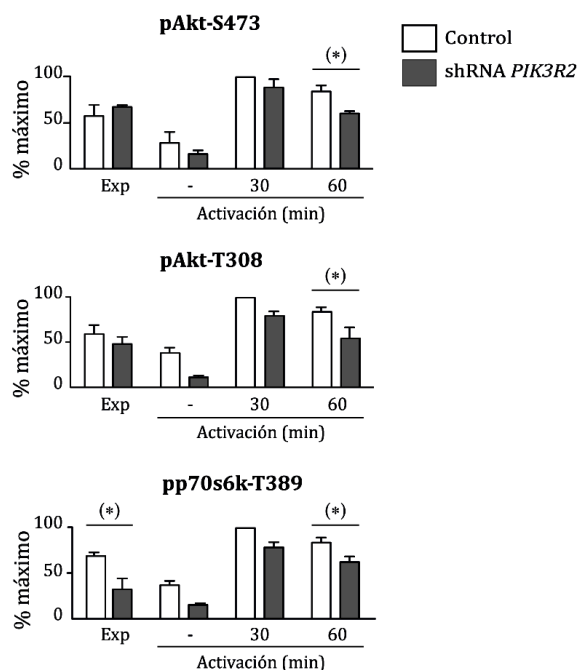
A**B**

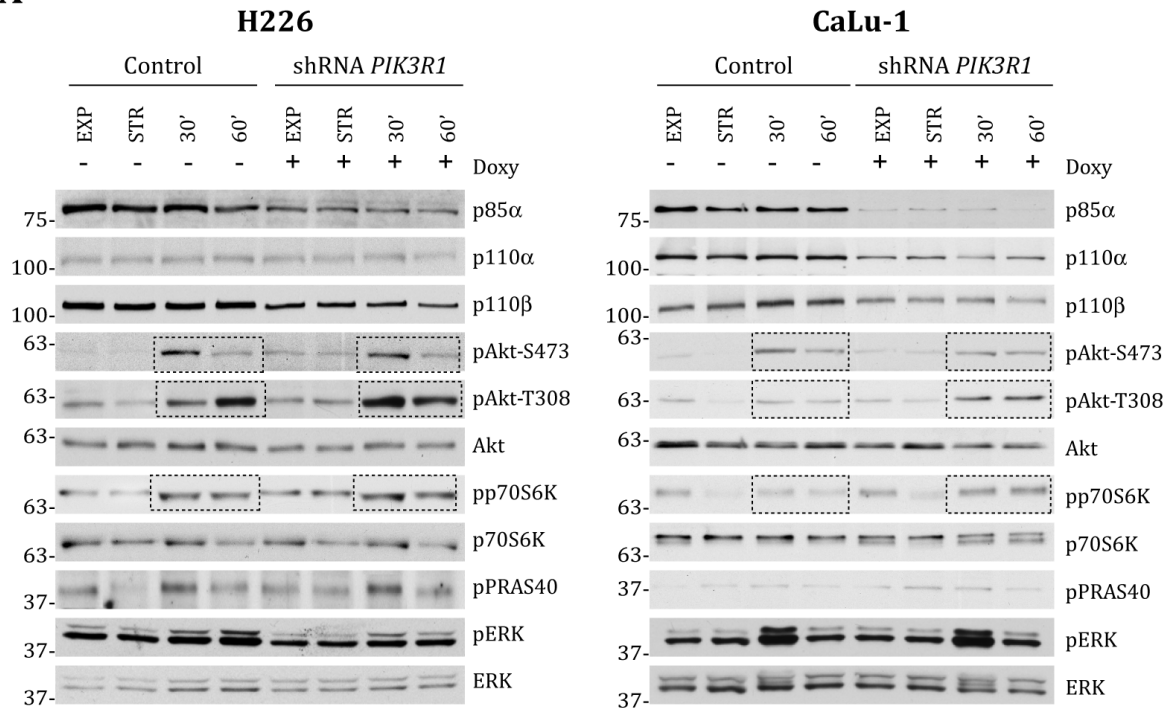
Figura 13.- El silenciamiento de p85β en CaLu-1 reduce la actividad de la ruta PI3K. Las células CaLu-1 se cultivaron con doxiciclina (5 mg/mL, 72h). Se analizaron las células en crecimiento exponencial (EXP), tras 16 horas de *starving* (STR), o tras el *starving* y la posterior re-estimulación durante 30 ó 60 minutos (30', 60'). (A) WB representativo de cada proteína analizada. (B) Cuantificación de los experimentos. El gráfico muestra la media ± SD. Para el análisis estadístico se aplicó el test t de Student, * $p < 0,05$. (n = 3).

líneas celulares estables con un shRNA dirigido contra el gen *PIK3R1*, inducibles por doxiciclina (CaLu-1- y H226-shRNA-*PIK3R1*). El silenciamiento de p85α fue diferente en cada línea celular; en CaLu-1, el silenciamiento fue correcto (mayor del 80%), mientras que en H226 fue en torno al 50% (**Figura 14**).

A pesar de que en ambas líneas celulares la reducción de p85α provocó una mayor bajada de los niveles de p110 que tras el silenciamiento de p85β, en H266 se observó un aumento de los niveles de fosforilación en Akt, p70S6K y PRAS40, que fueron significativos en las fosforilaciones de Akt Thr308 y en p70S6K Thr389 tras el *starving* de 16 horas (**Figura 14**). En el caso de la línea celular CaLu-1, se observó un aumento de los niveles de fosforilación de Akt Thr308 y de p70S6K Thr389 tras las re-estimulaciones posteriores al *starving*, aunque hubo una reducción en los niveles de fosforilación de Akt en el residuo Ser473.

Estos resultados refuerzan la conclusión de que p85β, y no la isoforma p85α, es la implicada en la activación de la ruta PI3K en estas líneas de SqCLC. La reducción de los

A



B

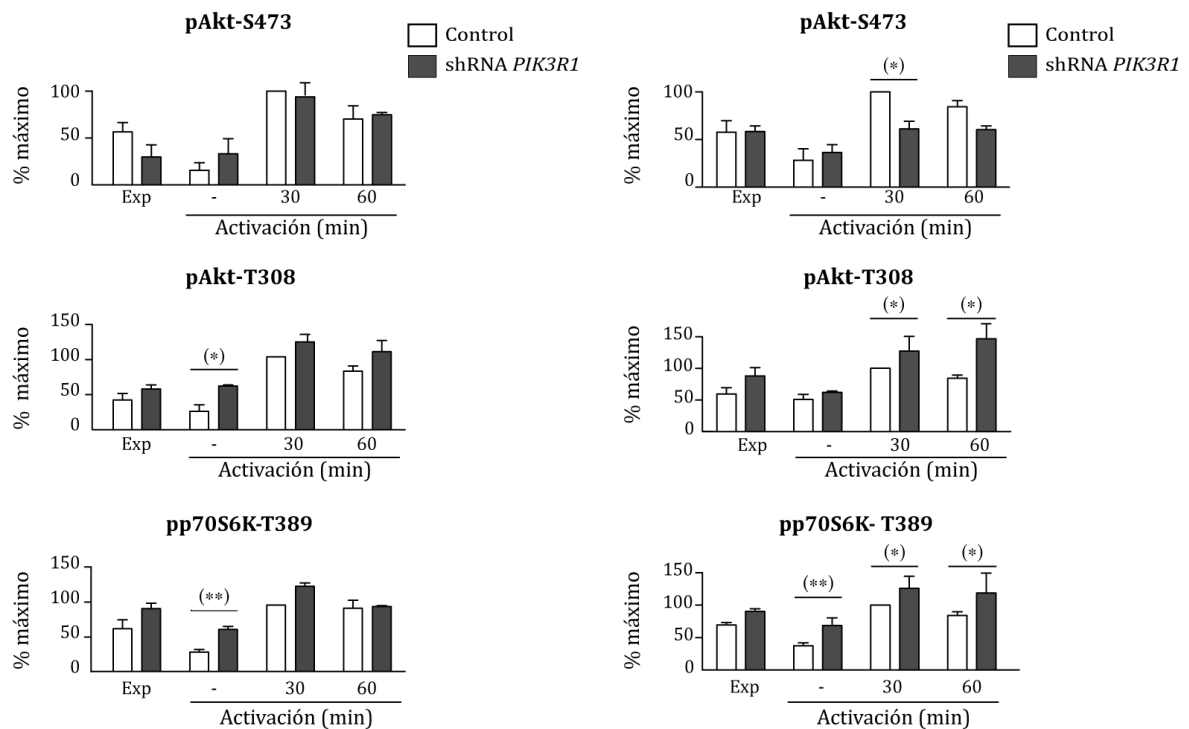


Figura 14.- El silenciamiento de p85α aumenta los niveles de actividad de la ruta de PI3K en células CaLu-1 y H226. Las células CaLu-1 y H226 se cultivaron con doxiciclina (5 y 2 mg/mL, 72h, respectivamente). Se analizaron las células en crecimiento exponencial (EXP), tras 16 horas de *starving* (STR), o tras el *starving* y la posterior re-estimulación durante 30 ó 60 minutos. **(A)** WB representativo de cada proteína analizada. **(B)** Cuantificación de los experimentos. El gráfico muestra la media \pm SD. Para el análisis estadístico se aplicó el test t de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (n = 3).

niveles de p85 α provoca un aumento en la proporción de los complejos p85 β /p110, lo que explica la mayor activación de la ruta de PI3K a pesar de la reducción de p85 α y la bajada de niveles de p110. En el caso de la fosforilación de la Ser473 de Akt, los datos sugieren que la activación de mTORC2 requiere, en parte, de la contribución de p85 α .

En conjunto, estos datos muestran que en las células de SqCLC, la proteína p85 β , y no p85 α aunque ésta se exprese, regula la activación de la ruta de PI3K, teniendo un mayor impacto en las células que la mutación endógena de *KRAS* [54,94,95].

4.- Estudio de la implicación de p85 β en la activación de FAK por Integrinas

Datos previos del laboratorio demuestran la implicación de p85 β en la regulación de la formación de invadopodios [36]. Tras demostrar la implicación de p85 β en el aumento de los niveles de activación de la ruta de PI3K, se decidió investigar el posible papel específico de p85 β en la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) en SqCLC, dada su importancia en la formación de invadopodios [96].

Se realizaron ensayos de activación de FAK a través de integrinas [97] en la línea celular CaLu-1, en la que se ha mostrado una mayor activación de la ruta de PI3K que correlaciona con la sobreexpresión de p85 β . Para determinar si se producía un aumento significativo en los niveles de activación de la proteína FAK, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se estudió la activación de FAK tras de las unión de las

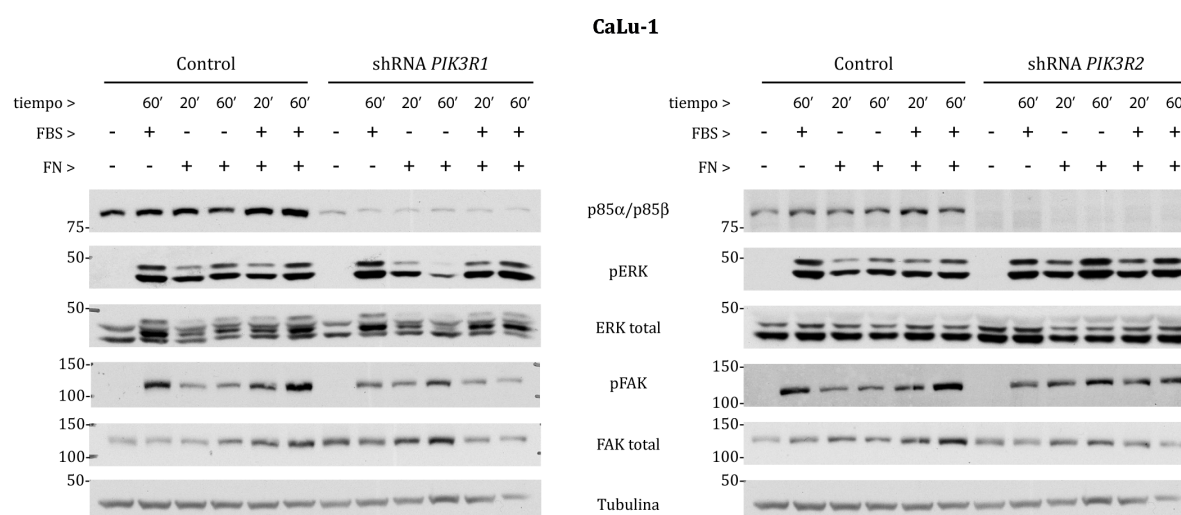


Figura 15.- La activación de FAK no es específica de una isoforma de p85 (n = 4). Las células CaLu-1 (shRNA vacío (control), shRNA *PIK3R1* y shRNA *PIK3R2*) se cultivaron con doxiciclina (5 mg/mL, 72h). Se levantaron las células y sembraron en diferentes condiciones: +/- fibronectina, y en ambos casos con +/- FBS durante 20 ó 60 minutos. (n = 4).

integrinas de membrana a fibronectina [98]. Para comprobar dicha hipótesis, se decidió analizar el estado de activación de FAK, cuyo primer paso es la autofosforilación en la Tyr397 [99], y, a su vez, también se analizaron los niveles de activación de Erk1/2 (Thr202/Thr204), puesto que está descrito que ambas proteínas están ligadas en la cascada de señalización implicada en la formación de invadopodios [100,101].

Tras realizar la estimulación de FAK *in vitro* a través de las integrinas, comprobamos su correcta activación por medio del estado de fosforilación del residuo Tyr397. En la línea celular CaLu-1, usando las líneas estables que contenían el vector vacío, el shRNA-*PIK3R1* y el shRNA-*PIK3R2*, se determinó un ligero aumento en los niveles de activación de FAK (fosfo-FAK Y397) y de Erk (fosfo-Erk1/2 T202/T204) tras el silenciamiento de p85 β , pero en los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas entre la reducción de los niveles de las diferentes isoformas de p85 (**Figura 15**).

Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que el silenciamiento de p85 β , al igual que el de la isoforma p85 α , no afectan al estado de activación de la quinasa FAK de manera significativa. En el sentido opuesto, decidimos estudiar si la sobreexpresión de p85 β podría provocar una activación de FAK y favorecer la producción de invadopodios [36]. En este caso, realizamos los experimentos utilizando clones de células NIH-3T3 estables

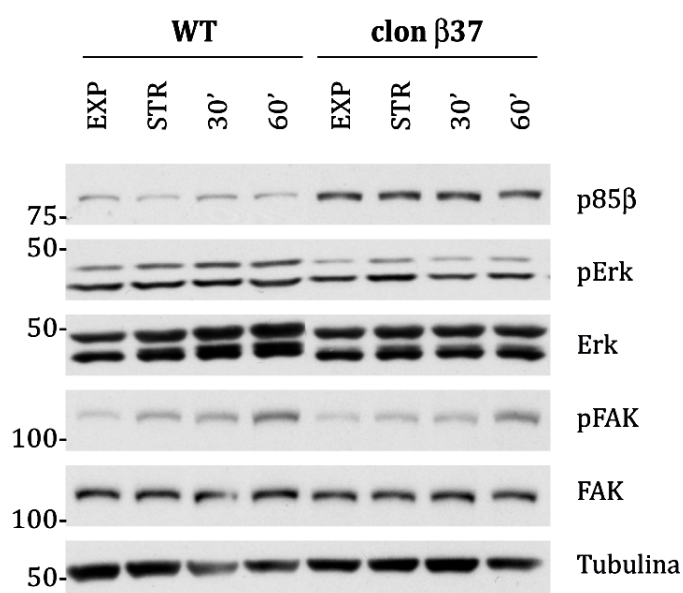


Figura 16.- El aumento de los niveles de p85 β no afecta a la actividad de FAK. Las células 3T3 WT y el clon β 37 se cultivaron y recogieron en crecimiento exponencial (EXP), tras 16 horas de *starving* (STR), y tras el *starving* y la posterior re-estimulación durante 30 ó 60 minutos. (n = 3).

que sobreexpresan p85 β , para analizar el estado de activación de la quinasa FAK. Los niveles de activación se analizaron en condiciones de crecimiento exponencial, tras 16 horas de *starving*, y también tras una re-estimulación con suero de 30 ó 60 minutos (**Figura 16**). Como consecuencia del aumento de p85 β , no se observan diferencias en los niveles de FAK fosforilado en la Tyr397. En cuanto a los niveles de Erk activo, se ve un ligero descenso tanto en fosfo-Erk como en Erk total, por lo que el ratio entre la cantidad total de Erk, y los niveles de Erk activo, se mantuvo similar. La leve reducción en los niveles de activación de FAK, apoyan los datos anteriores de que la subunidad reguladora p85 β no regula la activación de FAK en las líneas estudiadas.

5.- Estudio *in vivo* de la implicación de p85 β y p85 α en el crecimiento tumoral en líneas celulares de SqCLC.

5.1. Estudio de xenógrafos tras el silenciamiento de p85 β o p85 α

Tras estudiar *in vitro* la implicación de las isoformas de p85 en la activación de la ruta de PI3K en líneas SqCLC, se decidió trasladar esos resultados a tumores *in vivo*. Para ello, se planteó el estudio de las consecuencias de silenciar p85 β en tumores ya establecidos y que presentaban “*isoform switch*” (como son los de SqCLC) ya que el tratamiento en tumores establecidos no ha sido investigado previamente, y de ser exitoso demostraría su potencial terapéutico en el cáncer de células escamosas de pulmón. Se realizaron ensayos de xenotrasplantes con varias líneas celulares SqCLC en cepas de ratón *scid/scid* y *scid/beige*. Se inyectaron subcutáneamente entre 5 y 10 x 10⁶ células de las distintas líneas celulares en una solución de matrigel. Se esperaron de 7 a 10 días, según la línea celular, hasta que los tumores se establecieron y presentaban un tamaño medio de 75mm³. A continuación, se procedió al inicio del tratamiento con doxiciclina administrada en el agua de la bebida. Desde ese momento se empezó a monitorizar el volumen del tumor y el peso de los animales, tomando mediciones 2-3 veces por semana, y el ensayo se prolongó hasta alcanzar los criterios de punto final.

Utilizamos las líneas celulares estables con el vector inducible por doxiciclina shRNA-*PIK3R2* y como control, o las mismas líneas sin tratar con doxiciclina (shRNA – Doxi), o las líneas estables que contenían el vector vacío y que se trataron con doxiciclina (Control + Doxi) (**Figura 17**).

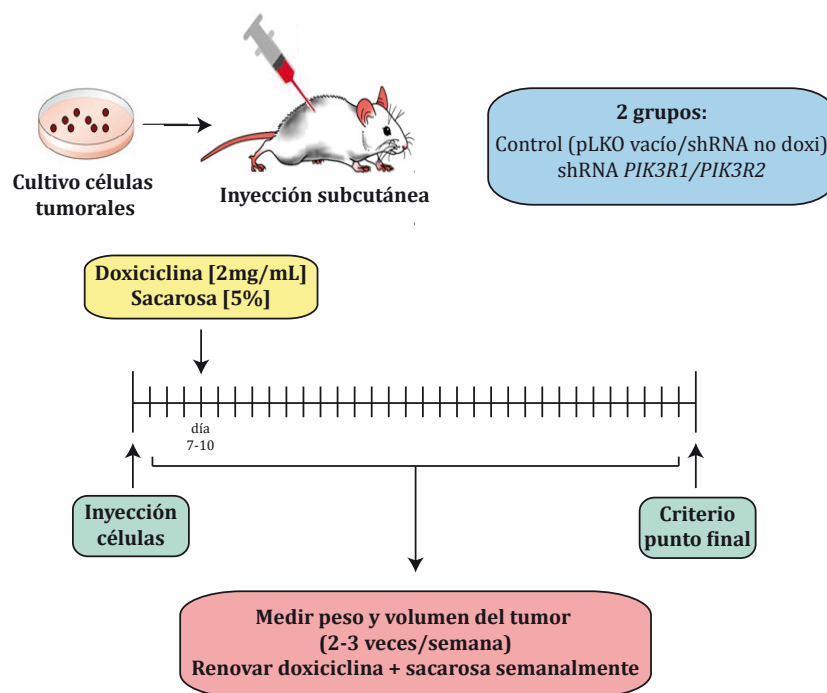


Figura 17.- Esquema de la estrategia de los experimentos con xenotrasplantes.

En los ensayos realizados en las líneas celulares con un ratio $p85\beta/p85\alpha$ menor que 2 (H2170 y HCC15), se determinó que no había diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado (aquellos que tenían los xenotrasplantes con el shRNA-*PIK3R2*). Incluso, en el estudio realizado con la línea celular HCC-15, se observó como los individuos del grupo tratado tuvieron una proliferación tumoral ligeramente superior respecto al grupo control, aunque las diferencias no fueron significativas (**Figura 18**). En las líneas celulares SK-MES y EPLC, con un ratio $p85\beta/p85\alpha$ mayor de 2 y 5, respectivamente, se obtuvieron diferencias significativas, con una tendencia similar en ambos casos. La línea celular SK-MES está considerada con un ratio intermedio, por lo que los resultados obtenidos se muestran en concordancia con la hipótesis, que hace referencia al ratio $p85\beta/p85\alpha$ como biomarcador para predeterminar la sensibilidad al tratamiento; por otra parte, la línea EPLC, aunque tiene un ratio elevado, de aproximadamente 6, tiene una tasa de proliferación celular muy baja, por lo que las diferencias que hay entre el grupo control y el tratado tienen un menor impacto (**Figura 19**).

Es importante destacar que los xenotrasplantes de SK-MES y EPLC se realizaron tanto en ratones *scid/scid* como en *scid/beige*. La cepa *scid/beige*, además de tener la mutación

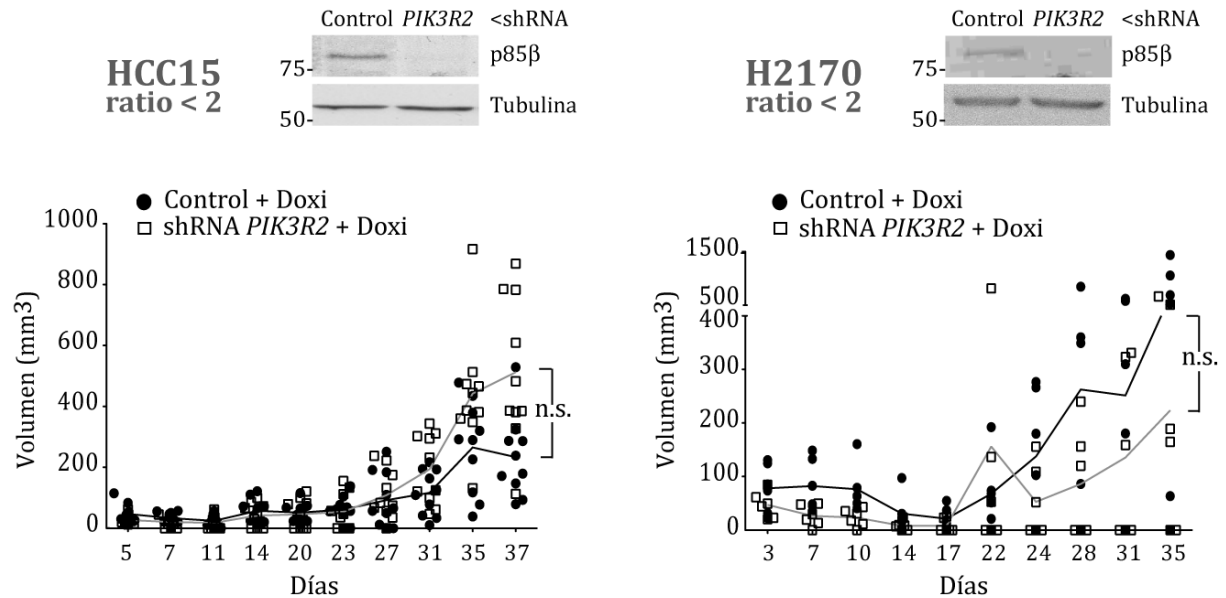


Figura 18.- El silenciamiento de p85β no afecta al crecimiento de los tumores con un ratio p85β/p85α menor que 2, HCC-15 y H2170. Los modelos de xenotrasplante se establecieron tras la inyección subcutánea de células HCC-15 o H2170 en ratones *scid/scid*. Tras finalizar el experimento, se recogieron los tumores, y se analizaron por WB. La gráfica muestra el volumen de los diferentes tumores de cada grupo medidos a diferentes días, tras el inicio del tratamiento. La línea de tendencia muestra la media del volumen de los tumores. Para el análisis estadístico se aplicó el test de ANOVA de 2 factores, n.s. = no significativo.

scid (del inglés *Severe Combined Immune Deficiency*) y presentar una deficiencia de las células T y B, son portadores de la mutación *beige*, que provoca una deficiencia en la respuesta citotóxica de las células NK [102,103], reduciendo las posibilidades de que los resultados obtenidos sean consecuencia de la acción del sistema inmunitario innato de los animales. De esta manera se pudo comprobar que la leve reducción del tamaño de los tumores fue debido de manera específica al tratamiento de interferir p85β, y no a la acción de las células NK, ya que los resultados obtenidos en ambos casos fueron similares.

Finalmente, se realizaron ensayos de xenotrasplantes con varias líneas celulares SqCLC que tienen un elevado ratio p85β/p85α. En este caso se utilizaron las líneas celulares H2882, H226 y H520, y también en la línea celular CaLu-1, que a pesar de tener un ratio p85β/p85α de 3, tiene la mutación endógena *KRAS*, que mantiene activa de manera constitutiva la ruta de MAPK.

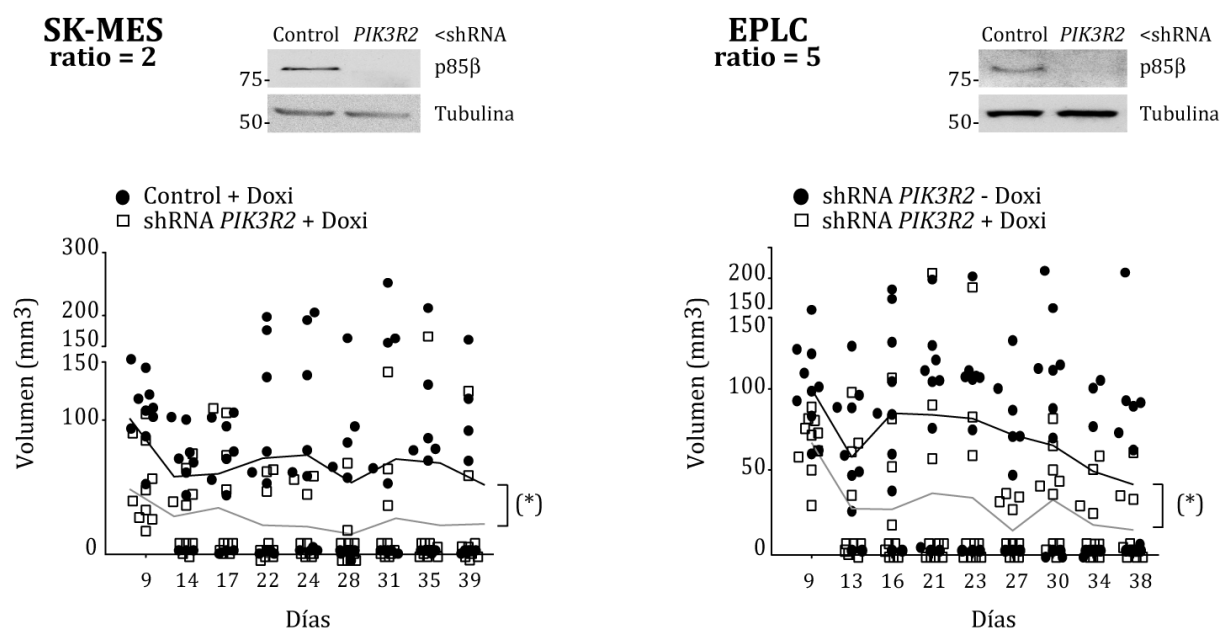


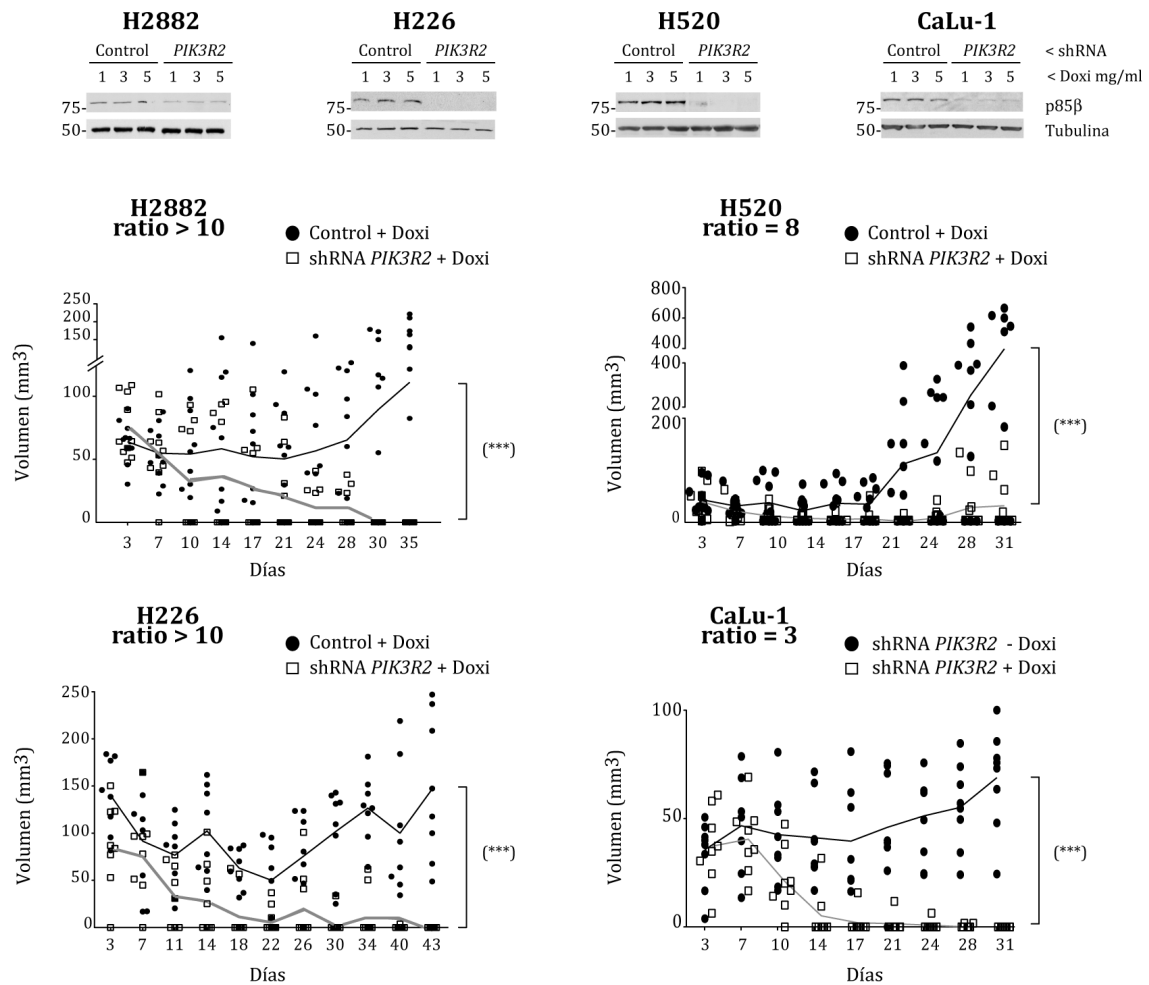
Figura 19.- El silenciamiento de p85β reduce en parte el tamaño de los tumores de SK-MES y EPLC. Los modelos de xenotrasplante se establecieron tras la inyección subcutánea de células SK-MES o EPLC en ratones *scid/beige*. Tras finalizar el experimento, se recogieron los tumores, y se analizaron por WB. La gráfica muestra el volumen de los diferentes tumores de cada grupo medidos a diferentes días, tras el inicio del tratamiento. La línea de tendencia muestra la media del volumen de los tumores. Para el análisis estadístico se aplicó el test de ANOVA de 2 factores, * p < 0,05.

Para realizar estos ensayos *in vivo*, se usaron diferentes grupos control. En el caso de las líneas celulares H2882, H226 y H520 se pudieron obtener líneas estables con el vector vacío incorporado, mientras que en la línea CaLu-1 se utilizó como grupo control los animales a los que se le inocularon las células shRNA-PIK3R2, pero no se les administró la doxiciclina en el agua de la bebida.

En los cuatro casos, se obtuvo una regresión tumoral muy pronunciada tras la reducción de p85β (**Figura 20**). En el ensayo con la línea celular H520 la mayoría de los tumores sufrieron una reducción drástica hasta su completa desaparición, aunque hubo algunos tumores cuyo volumen se redujo sin llegar a desaparecer por completo.

En los otros tipos tumorales (H2882, H226 y CaLu-1), se obtuvo una regresión virtualmente completa de los tumores tras silenciar p85β. Por el contrario, en los grupos control de los distintos ensayos con estas líneas, la mayoría de los tumores generados tuvieron un crecimiento descontrolado llegando, como mínimo, a duplicar su volumen inicial. Hubo algún caso aislado de regresión tumoral en los grupos control, pero no afectó a la estadística global de los diferentes ensayos.

A



B

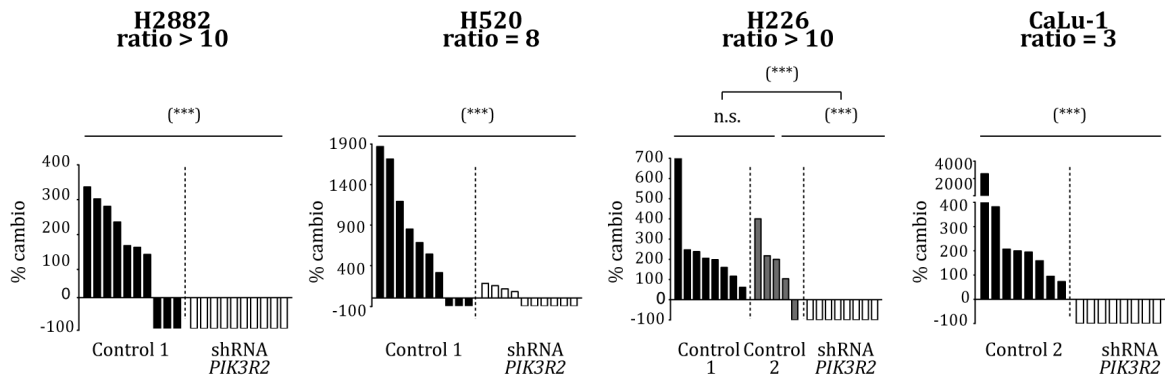


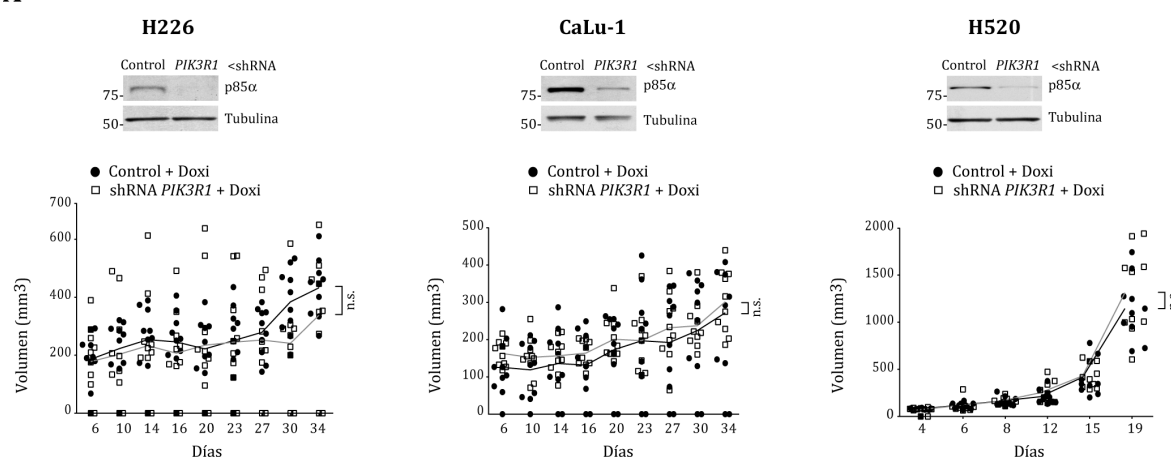
Figura 20.- El silenciamiento de p85β provoca una regresión de tumores con elevado ratios de p85β/p85α: CaLu-1, H226, H2882 y H520. Los modelos de xenotrasplante se establecieron tras la inyección subcutánea de células CaLu-1, H226, H2882 y H520 en ratones *scid/scid*. Tras finalizar el experimento, se recogieron los tumores, y se analizaron por WB. (A) La gráfica muestra el volumen de los diferentes tumores de cada grupo medidos a diferentes días. La línea de tendencia muestra la media del volumen de los tumores. Para el análisis estadístico se aplicó el test de ANOVA de 2 factores, *** $p < 0,001$. (B) La gráfica muestra la variación del volumen de cada tumor entre el primer y el último día del experimento. Para el análisis estadístico se aplicó el test de Chi cuadrado, n.s. = no significativo; *** $p < 0,001$.

Para confirmar la implicación específica de la isoforma p85 β en la progresión tumoral *in vivo*, se repitieron los experimentos de xenotrasplantes con las líneas celulares H226, H520 y CaLu-1 reduciendo, en esta ocasión, los niveles de p85 α y usando los mismos controles de vector vacío que anteriormente (**Figura 21**).

Tras el establecimiento de los tumores y el inicio del tratamiento, se observó desde el principio un aumento progresivo del volumen de los tumores en todos los individuos, con una clara tendencia de crecimiento y progresión tumoral de similares características tanto en el grupo control como en el grupo de los tumores que expresaban el shRNA-*PIK3R1*.

En conjunto, estos datos confirman que p85 β , y no la subunidad p85 α , ejerce una función esencial en la progresión tumoral *in vivo* en líneas celulares de cáncer de células escamosas de pulmón, y su silenciamiento induce regresión tumoral.

A



B

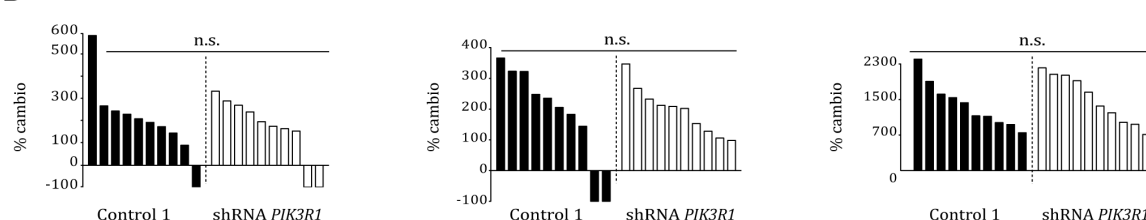


Figura 21.- El silenciamiento de p85 α no afecta a la progresión tumoral de los tumores de CaLu-1, H226 y H520. Los modelos de xenotrasplante se establecieron tras la inyección subcutánea de células CaLu-1, H226 o H520. Tras finalizar el experimento, se recogieron los tumores, y se analizaron por WB. **(A)** La gráfica muestra el volumen de los diferentes tumores de cada grupo medidos a diferentes días. La línea de tendencia muestra la media del volumen de los tumores. Para el análisis estadístico se aplicó el test de ANOVA de 2 factores, n.s. = no significativo **(B)** La gráfica muestra la variación del volumen de cada tumor entre el primer y el último día del experimento. Para el análisis estadístico se aplicó el test de Chi cuadrado, n.s. = no significativo.

5.2. Análisis histológico de los tumores a tiempo medio: marcadores celulares de apoptosis y mitosis.

Tras finalizar los ensayos *in vivo* y obtener muestras de los tumores finales, se decidió estudiar, por medio de análisis histológicos y en colaboración con la unidad de Histología y Patología de la Universidad de Navarra, los diferentes marcadores moleculares de apoptosis y de actividad mitótica en cada grupo de muestras, con el fin de obtener mayor información sobre la acción específica de cada isoforma de p85. Debido a que la mayoría de los tumores tratados con shRNA-*PIK3R2* tuvieron una regresión total, se realizó un experimento de xenotrasplantes con interrupción a tiempo medio del tratamiento, con objeto de disponer de volumen de muestra para el análisis. Se utilizaron las mismas condiciones con las líneas celulares CaLu-1 y H226 (control, shRNA-*PIK3R1* y shRNA-*PIK3R2*). Tras inocular las células y que los tumores se establecieran, se comenzó el tratamiento con doxiciclina en todos los animales, y tras el inicio de la regresión de los tumores, se sacrificó a los animales y se extrajeron los tumores, finalizando el experimento para tener muestras tumorales de todos los grupos.

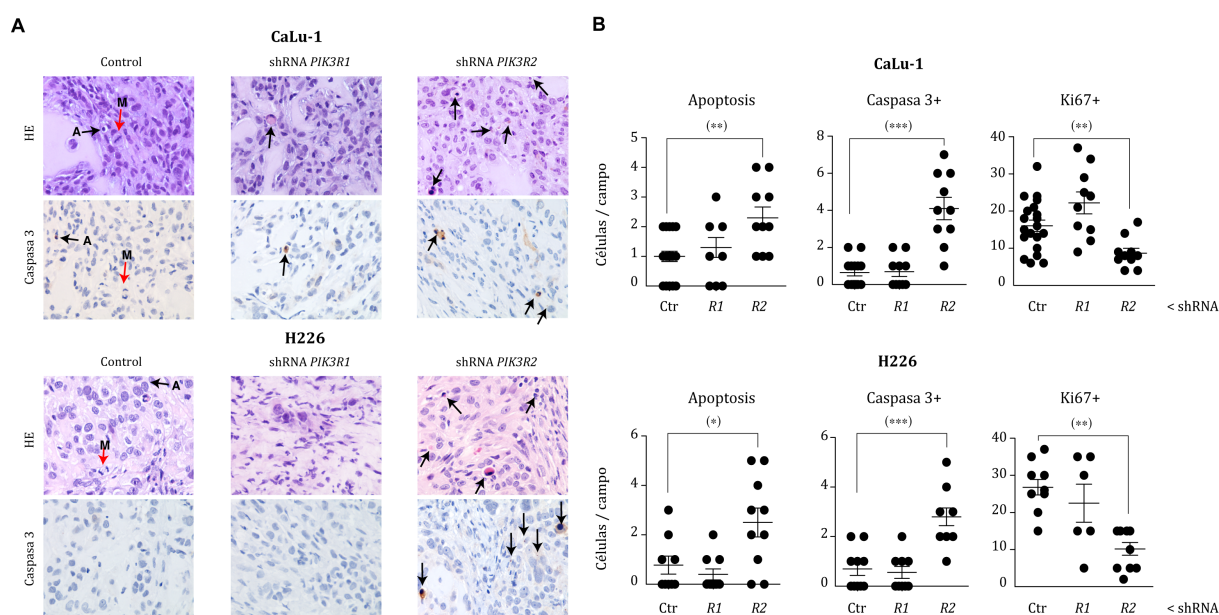


Figura 22.- El silenciamiento de p85 β provoca una menor tasa de división celular e induce muerte celular. Los animales fueron sacrificados tras el inicio de la regresión de los tumores, se obtuvieron los tumores y se analizó su histología. **(A)** En cortes histológicos de los tumores se realizaron tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE) o Caspasa 3. Flecha roja (M) = Célula mitótica, flecha negra (A) = Célula apoptótica. **(B)** En los cortes histológicos se contabilizó el número de células apoptóticas, y las células que resultaron positivas para los marcadores de Caspasa 3 y Ki-67. Para el análisis estadístico se aplicó el test t de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tanto en CaLu-1 como en H226, se comprobó que había más células positivas para marcadores de apoptosis como Caspasa 3 en los tumores shRNA-*PIK3R2*, cuando se comparaban con las muestras de los grupos control y shRNA-*PIK3R1*, que presentaban una pequeña cantidad de células apoptóticas. Además, las muestras que tenían un bajo número de células apoptóticas, tenían mayor número de células positivas para el marcador de mitosis Ki-67 [104] que las muestras tratadas con shRNA-*PIK3R2* (**Figura 22**).

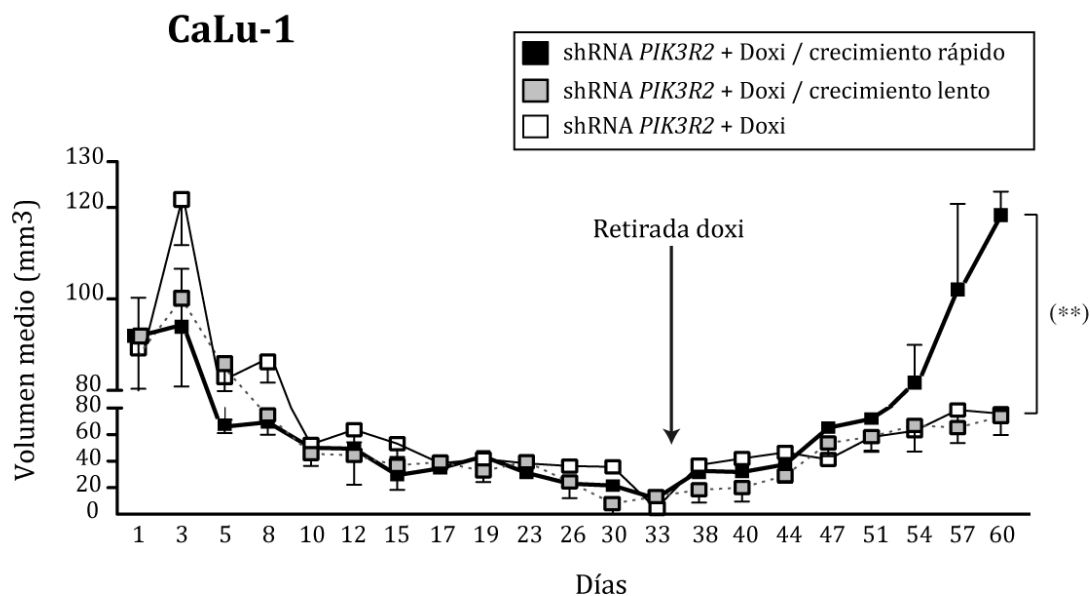
Estos datos apoyan la importancia de p85 β en la progresión del ciclo celular y la mitosis, y en su implicación en la supervivencia celular.

5.3. Estudio de xenógrafos tras el silenciamiento de p85 β a tiempo prolongado

Para comprobar si la reducción del tamaño de los tumores en los que se silenciaba p85 β requería la presencia continuada del shRNA *PIK3R2*, realizamos un ensayo de las mismas características que los anteriores, pero prolongando el tratamiento durante más tiempo. Para ello, generamos una nueva serie de xenotrasplantes con la línea celular estable CaLu-1 shRNA *PIK3R2*. Tras el tratamiento y la reducción del tamaño de los tumores, aproximadamente a día 35, se separaron los animales en dos grupos distintos. Uno de ellos seguiría con el tratamiento de doxiciclina hasta el punto final (un mes adicional), mientras que en el segundo grupo se retiraba el tratamiento con doxiciclina, con el fin de comprobar si había una recuperación total, parcial o nula de los niveles basales de expresión de p85 β , y además, observar si había una recuperación del crecimiento tumoral. Como en los experimentos anteriores, el tamaño de los tumores fue medido dos/tres veces por semana. Después de 25 días tras la separación de los animales en dos grupos nuevos, se sacrificaron los animales y analizaron los niveles de p85 β en los tumores (**Figura 23**).

El análisis del volumen de los tumores mostró que durante la primera parte del ensayo, en la que todos los animales estaban bajo el tratamiento con doxiciclina, había una tendencia de regresión en todos los tumores. Tras llegar a mitad del ensayo, cuando se produjo dicha regresión, se realizó la separación de los animales en dos nuevos grupos. En el grupo de individuos que siguió con la doxiciclina, el volumen de los tumores se mantuvo en valores bajos, aunque se puede apreciar un ligero aumento progresivo al final del experimento (**Figura 23, cuadrados blancos**), sugiriendo que no se produce

A



B

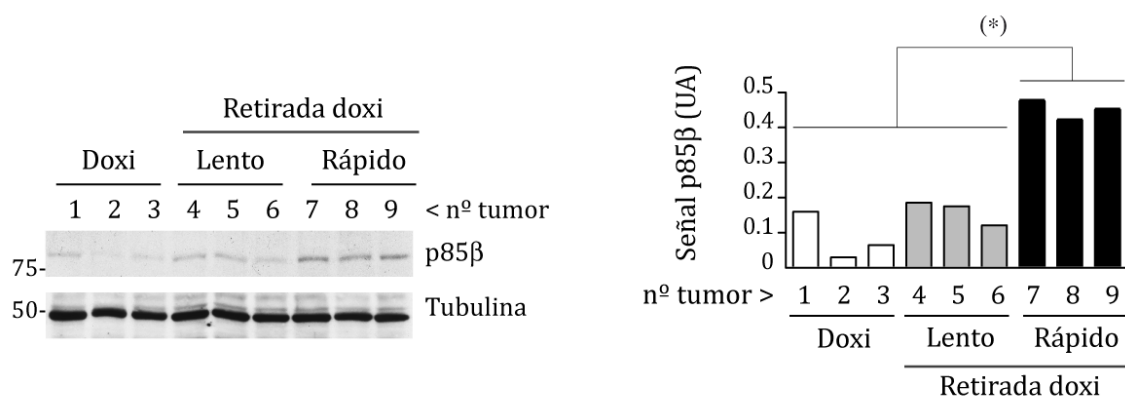


Figura 23- El silenciamiento de p85β provoca una regresión de los tumores de CaLu-1, y tras retirar el tratamiento, la mitad de los tumores recupera su alta capacidad de proliferación y la otra mitad se mantiene a pequeño tamaño. Los modelos de xenotrasplante se establecieron tras la inyección subcutánea de células CaLu-1. Tras el experimento, se recogieron los tumores, y fueron analizados por WB. **(A)** La gráfica muestra el volumen de los diferentes tumores de cada grupo medidos a diferentes días. **(B)** Tras finalizar el experimento, los tumores se lisaron con una solución de lisis RIPA, y se analizaron los niveles de p85β por WB. La gráfica muestra la variación del tumor entre el primer y el último día del experimento. Para el análisis estadístico se aplicó el test de ANOVA de 2 factores, ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

resistencia en este periodo. En el otro grupo de animales, a los que se les retiró el tratamiento, se observaron dos patrones distintos de comportamiento. Un subgrupo de tumores presentó unos valores de crecimiento muy elevados (**Figura 23, cuadrados negro**), mientras que el otro subgrupo tuvo unos niveles de crecimiento basal lento, igual al de los ratones con el tratamiento mantenido (**Figura 23, cuadrados grises**). Tras analizar los niveles de p85β de los tumores por WB, encontramos que, como era de esperar, el grupo con el tratamiento mantenido presentaba niveles de expresión de

p85 β muy bajos. Por su parte, en el grupo en el que se interrumpió el tratamiento, el subgrupo formado por aquellos tumores que tuvieron un crecimiento rápido presentaban niveles altos de expresión de p85 β , mientras que el subgrupo con una baja tasa de crecimiento, tenían niveles bajos de p85 β .

Estas observaciones confirman la implicación de p85 β en la progresión tumoral, y la correlación entre los niveles de p85 β y la progresión tumoral. Por otra parte, la re-expresión de la proteína p85 β en tumores en los que previamente se había silenciado confirmó que el efecto de inhibición del crecimiento tumoral se debe a la baja expresión de esta proteína, y que, en el cáncer de células escamosas de pulmón, p85 β es necesaria para el crecimiento y la progresión tumoral.

6.- Implicación de p85 β en el ciclo celular

Una vez demostrada la implicación de p85 β en la progresión tumoral de SqCLC en los modelos *in vivo*, el siguiente paso fue examinar el efecto de la reducción de la subunidad reguladora en la progresión del ciclo celular. Para ello, se realizaron ensayos de pulso y caza con bromodesoxiuridina (BrdU) [34] en las líneas celulares CaLu-1, H226 y HCC-15, utilizando esta última como control, al ser una línea celular de SqCLC que no presenta elevados niveles de expresión de p85 β y es resistente al tratamiento.

Para optimizar el tiempo de pulso de BrdU necesario para cada línea celular (que depende de su tiempo de duplicación), se sembraron varias placas por línea celular, y cada una recibió un pulso de BrdU de diferente tiempo (30, 60 ó 90 minutos). Durante el tiempo del pulso, aquellas células que estén en fase S incorporan BrdU a las nuevas cadenas de ADN formadas, siendo detectable por tinción con anticuerpos anti-BrdU. Tras el pulso, se retira el BrdU, y se puede seguir la progresión de las células positivas para BrdU desde la fase S, por G2/M y G0/G1, midiendo simultáneamente los niveles de BrdU y de ADN (4N y 2N, respectivamente). Se decidió hacer un pulso de BrdU de 60 minutos para las líneas CaLu-1 y HCC-15, y un pulso de 90 minutos para las células H226.

Tras determinar el mejor tiempo para hacer el pulso, se sembraron las diferentes líneas celulares (con expresión del vector vacío, shRNA *PIK3R1* y shRNA *PIK3R2*), se les administró doxiciclina para inducir la expresión del shRNA, y tras 72 horas de tratamiento, fueron marcadas con el pulso de BrdU. Tras el pulso, se retiró el medio con

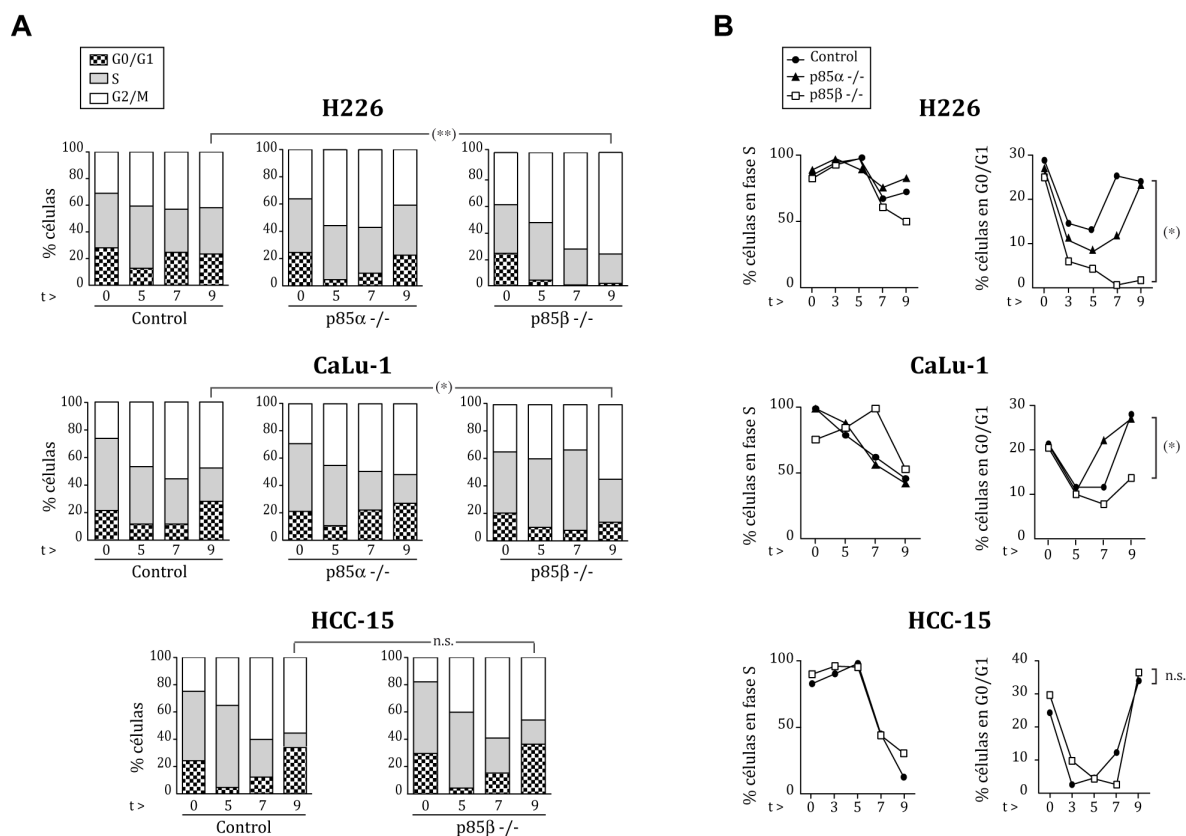


Figura 24.- El silenciamiento de p53 reduce la progresión del ciclo celular en líneas con alto ratio p53/p85α. (A) Las células H226, CaLu-1 y HCC-15 fueron marcadas con un pulso de BrdU. Posteriormente se analizó, a diferentes tiempos (t), la transición de las células en el ciclo celular, con ioduro de propidio y anti-BrdU-FITC. Para el análisis estadístico se aplicó el test de Chi cuadrado, ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; n.s. = no significativo. (B) Las gráficas de la izquierda representan la cantidad de células en fase S respecto al máximo a diferentes tiempos; las gráficas de la derecha representan el porcentaje de células en G0/G1 a diferentes tiempos. Para el análisis estadístico se aplicó el test de t de Student, * $p < 0,05$; n.s. = no significativo. $n = 3$.

BrdU, se les añadió nuevo medio con doxiciclina (sin BrdU), y se incubaron las células durante diferentes tiempos para poder monitorizar el avance del ciclo celular en ausencia de cada una de las isoformas de p53 (**Figura 24**).

Al analizar los datos de las líneas celulares derivadas de H226 se observó que, en las líneas control y shRNA-*PIK3R1*, el menor porcentaje de células en G0/G1 se producía a 5 horas tras el pulso. En los siguientes tiempos (7 y 9 horas) se vio un aumento del porcentaje de células en G0/G1, que se corresponde con los descensos en las fases S y G2/M. Estos datos muestran que las células marcadas con el BrdU durante el pulso, tardaron más de 5 horas en completar el ciclo celular, y entrar en fase G0/G1. En la línea celular shRNA-*PIK3R2*, tras las 5 horas del pulso, se observaron unos niveles similares de células en G0/G1 que en la línea shRNA-*PIK3R1*. Sin embargo, en los siguientes

tiempos analizados, se observó que el porcentaje de células en G0/G1, así como en fase S, seguían disminuyendo, a la vez que aumentaban los porcentajes de células en G2/M, con un porcentaje máximo tras 9 horas desde el pulso (73% del total). Sin embargo, aunque se ve un pequeño aumento del porcentaje de células en fase G0/G1 (a 7 horas hay un 1,5%, y a 9 horas un 4%), sería de esperar un mayor porcentaje en G0/G1. Los datos muestran que son una mínima parte del total de células, sugiriendo una ralentización del paso de fase M a G0/G1. Las células H226 poseen un ratio $p85\beta/p85\alpha$ mayor de 10, con unos valores de expresión de $p85\alpha$ muy bajos, por lo que el silenciamiento de $p85\beta$ puede provocar que no haya las suficientes moléculas de $p85$ para la ejecución de la citocinesis [34], acumulándose en fase G2/M. Estos datos indican que las células H226 shRNA-*PIK3R2* requieren más tiempo para finalizar el ciclo celular, y presentan una ralentización en el paso de fase M a G0/G1. En las células CaLu-1, tras silenciar cada isoforma se determinó que, en el caso de $p85\beta$, se producía un retraso en la progresión del ciclo celular, siendo visible a 7 y 9 horas, donde se observó que había un porcentaje parecido de células en los grupos control y shRNA-*PIK3R1* en G0/G1, mientras que en las células tratadas con shRNA-*PIK3R2*, éstas se acumulan en fase S. En las células CaLu-1, que tienen un mayor nivel de $p85\alpha$ que H226, cuando se silenció $p85\beta$ sí fueron capaces de transitar de fase G2/M a G0/G1, aunque su velocidad de transición por fase S, en comparación con las otras dos líneas celulares, fue menos. Estos datos sugieren que no es necesaria, de manera exclusiva, la presencia de $p85\beta$ para poder finalizar el ciclo celular, sino que podría ser necesaria una cantidad mínima de $p85$ para que fuera posible terminar la fase G2/M y que las células entren en fase G0/G1; además, $p85\beta$ regula el tránsito por fase S de las células CaLu-1.

Por último, como control se utilizó la línea celular HCC-15 (esta línea celular no responde al tratamiento de reducir $p85\beta$). Tras silenciar $p85\beta$, no se presentaron diferencias significativas entre las células control y las shRNA-*PIK3R2*.

Los resultados obtenidos en las distintas líneas muestran que el silenciamiento de $p85\beta$ afecta a la progresión del ciclo celular, provocando un retraso en fase S y G2/M. Estos datos sugieren que la subunidad $p85$ es necesaria para finalizar el ciclo celular totalmente. En este caso, no parece tan importante el ratio $p85\beta/p85\alpha$, como la cantidad mínima de $p85$ presente en las células. El silenciamiento de $p85\beta$ en las células H226, que apenas tienen una cantidad mínima de $p85\alpha$ (**Figura 10**), provocó la acumulación

de las células en fase G2/M, mientras que en las células CaLu-1, que expresan p85 α en unos niveles normales, la reducción de p85 β provocó un retraso en el ciclo celular, pero las células no se acumularon en G2/M, aunque presentaron una ralentización de salida de fase S y de G2/M a G0/G1 (**Figura 24**).

7.- Estudio del efecto del silenciamiento de p85 β en los mecanismos de regulación negativa de la ruta de PI3K y comparación con el uso de inhibidores.

La estimulación de receptores de membrana provoca la activación de rutas de señalización que inducen respuestas celulares. Esta activación es, normalmente, transitoria con el fin de preservar el estado de reposo de las células. La ruta de PI3K cuenta con mecanismos de regulación negativa que permiten reducir los niveles de activación tras la acción de un estímulo, evitando una respuesta celular exacerbada. Tras la activación de la enzima PI3K, la señal avanza por los distintos efectores de la ruta incluyendo Akt/PKB, mTORC1 y p70S6K. Cuando la proteína p70S6K se activa, es capaz de fosforilar a un grupo de proteínas adaptadoras llamadas IRS [105], las cuales sufren cambios conformacionales que inhiben la posterior unión de la subunidad reguladora p85 y la translocación y acción de los complejos p85/p110 en la membrana [106].

Actualmente se están llevando a cabo una serie de ensayos clínicos en los que se utilizan diferentes inhibidores de la ruta de PI3K [67,107]. Estos inhibidores tienen como dianas, principalmente, a la subunidad catalítica p110 (inhibidores pan-específicos, o dirigidos contra alguna isoforma de p110) o los complejos mTOR. La eficacia de los mismos está siendo limitada varios problemas: estos inhibidores actúan no solo bloqueando la activación de PI3K, sino que también bloquean su posterior atenuación a través de p70S6K y el bucle de retroalimentación negativa, y afectan a la regulación que se produce en el *cross-talk* entre la rutas de PI3K y MAPK. Aunque otras vías de señalización también son capaces de participar en la activación de Akt, la falta de la ruta de atenuación induce una activación constante de la vía, provocando que no se consiga el objetivo de estos inhibidores [69]. Hasta la fecha, sólo hay un trabajo en el cual se describe el uso de un inhibidor de p85 como un posible tratamiento en el cáncer de mama. *In vitro*, el inhibidor reduce los niveles de activación de la ruta de PI3K, mientras que *in vivo* los resultados muestran una menor tasa de proliferación celular, que se correlaciona con un menor crecimiento de los tumores, aunque en ningún caso se observa una regresión tumoral [108].

En base a estos datos, se decidió comparar los efectos del tratamiento con agentes interferentes de la subunidad reguladora p85 α o p85 β con la utilización de inhibidores de la actividad enzimática de PI3K. Se compararon varios inhibidores de p110 (Ly294002: inhibidor pan-PI3K; TGX221: inhibidor específico de p110 β y PIK-75:

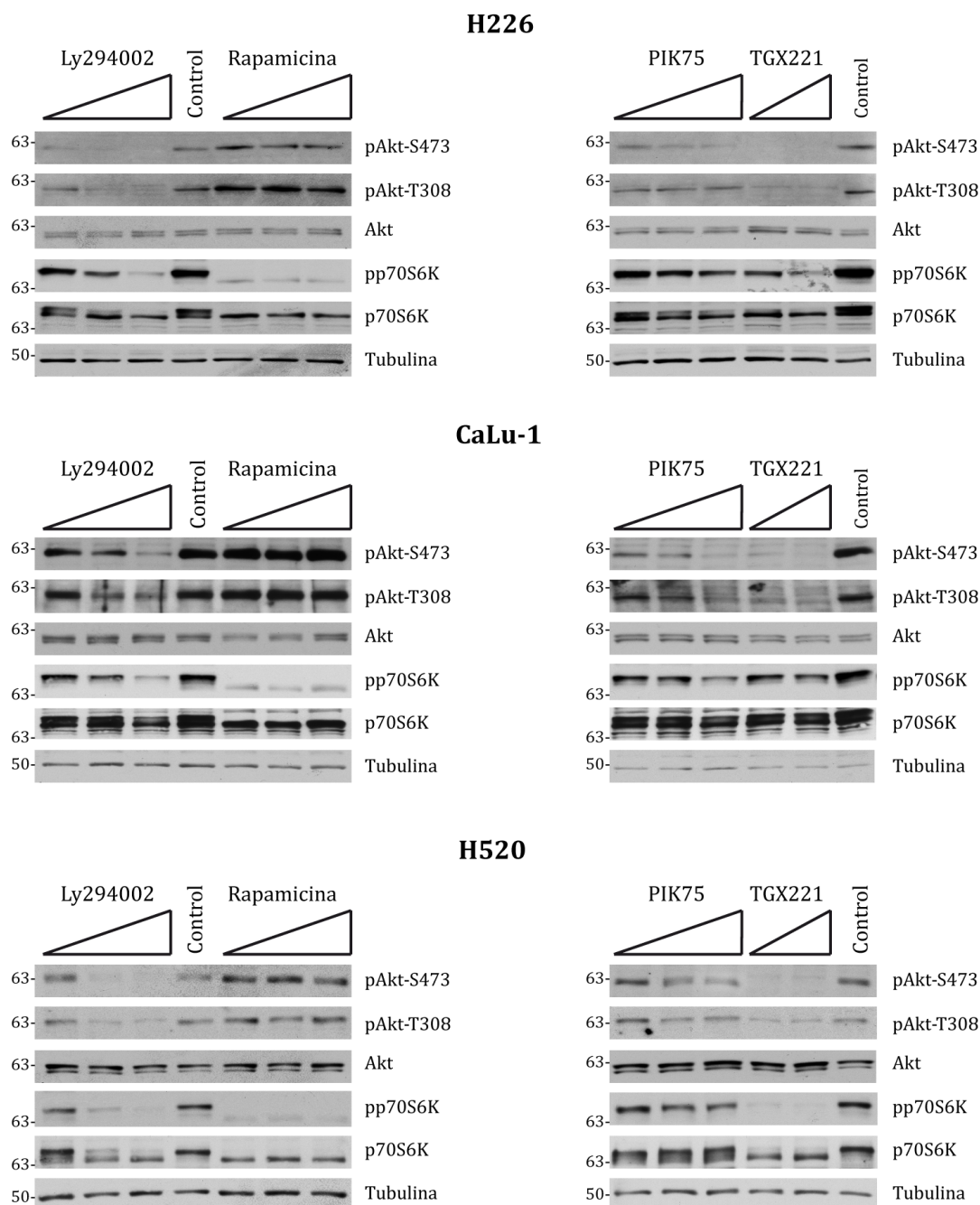


Figura 25.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria de cada inhibidor en líneas de SqCLC. Las diferentes líneas SqCLC (H226, CaLu-1 y H520) se trataron durante una hora con diferentes inhibidores, a distintas concentraciones cada uno: Ly294002 (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M), PIK-75 (0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,2 μ M), TGX221 (15 μ M, 30 μ M) y Rapamicina (25 μ M, 50 μ M, 100 μ M). Los niveles de activación de Akt y p70S6K se analizaron por WB. n = 3.

inhibidor específico de p110 α) y un inhibidor de mTOR (Rapamicina). En primer lugar se realizaron una serie de experimentos para determinar las concentraciones mínimas de cada inhibidor (CMI) requeridas para detectar la inhibición producida por cada compuesto. Este estudio se realizó utilizando las líneas celulares H226, CaLu-1 y H520. Cada una de ellas se incubó en presencia de los distintos inhibidores, a distintas concentraciones, durante una hora. Los lisados celulares se analizaron por WB. En concreto, se analizaron los efectores de PI3K Akt y p70S6K, cuyos residuos fosforilados (Ser308 y Ser473 en Akt, Thr389 en p70S6K) se correlacionan con el estado activo de cada una de estas proteínas.

Como estaba descrito previamente, los distintos inhibidores de PI3K provocaron una disminución en los niveles de activación de Akt y p70S6K, mientras que la rapamicina afectó exclusivamente a p70S6K (**Figura 25**). Las concentraciones óptimas fueron 5 μ M de Ly294002 (Ly en adelante), 0.2 μ M de PIK-75 (PIK) y 30 μ M de TGX221 (TGX). Una vez conocidas las CMI óptimas de cada inhibidor, se comparó el efecto de estos compuestos a tiempos cortos (1h) y tras un tratamiento prolongado (48h), con el fin de determinar si, también en las líneas de SqCLC, el tratamiento prolongado con inhibidores bloqueaba el *feedback* negativo, promoviendo la reactivación de la ruta.

En las células H226, el tratamiento con Ly y TGX provocó una disminución en el grado de activación de Akt y PRAS40 tras 1 hora de tratamiento, y una posterior reactivación a 48 horas (**Figura 26**). Por el contrario, en el tratamiento con PIK o combinado con PIK + TGX, se observó una reducción en los niveles de p-Akt y p-PRAS40 tras 1 hora de tratamiento, que fue incluso mayor tras 48 horas. En el caso de p70S6K, tanto PIK como TGX lo inhibieron a 1h pero no a 48h; si bien la combinación de PIK y TGX fue capaz de mantenerlo inhibido a 48h (**Figura 26**). Este último dato está de acuerdo con la observación de que, en algunos tipos celulares, existe una activación compensatoria de p110 β tras inhibir p110 α , por lo que la inhibición de ambas isoformas es más eficiente que cada una de éstas por separado [75]. También es destacable que Ly provocó un gran efecto inhibidor en p70S6K, que por la dosis utilizada no se debe a su capacidad de inhibir mTOR, que se produce a concentraciones mayores [109].

Todos estos datos llevaron a la conclusión de que la ruta de PI3K, en la línea celular H226, podría ser inhibida de una manera eficaz por medio de la combinación de inhibidores TGX+PIK. Sin embargo, cabe destacar que el uso conjunto de ambos

inhibidores también provocó un aumento de los niveles totales de Erk y Erk fosforilado (**Figura 26**). El aumento de Erk fosforilado refleja la activación de un mecanismo compensatorio cruzado previamente descrito [53]. En los ensayos con las células CaLu-1 se observó un claro efecto rebrote en la activación de la ruta de PI3K tras las 48 horas de tratamiento con los diferentes inhibidores. Todas las combinaciones de inhibidores

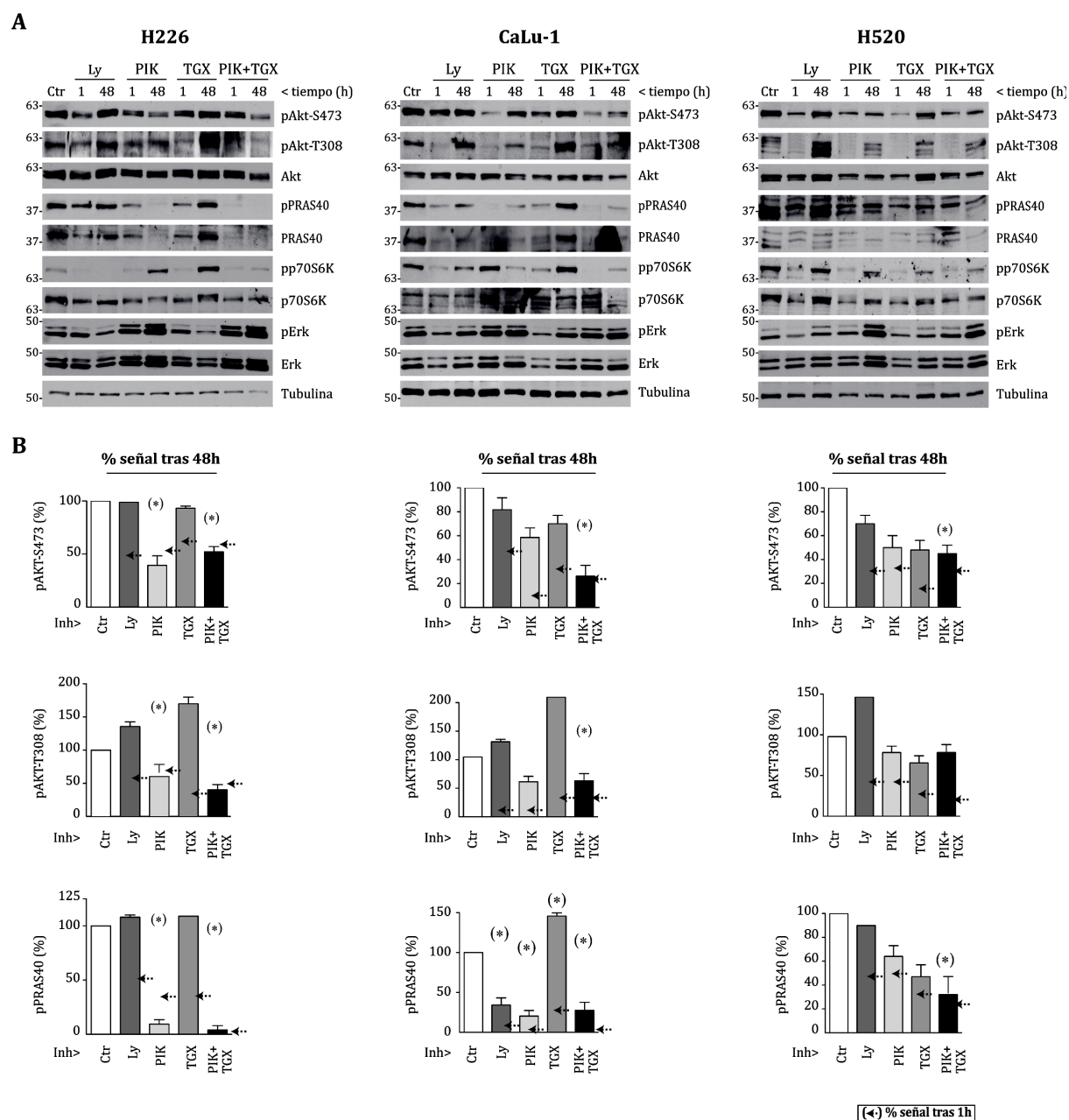


Figura 26.- Determinación de la reactivación de la ruta PI3K tras el tratamiento con diferentes inhibidores a tiempos largos. (A) Análisis del estado de activación de la ruta PI3K a corto y largo tiempo con inhibidores (1h y 48h, respectivamente). Los niveles de activación de Akt, p70S6K, PRAS40 y Erk fueron analizados por WB. **(B)** Estado de activación de Akt y PRAS40 tras el uso de los diferentes inhibidores, y comparando la señal entre 1h y 48h con el tratamiento. Las flechas indican el estado de activación tras 1 hora de tratamiento. n = 3.

analizadas (Ly, PIK, TGX y PIK+TGX) provocaron una reactivación de Akt –en ambas fosforilaciones-, PRAS40 y p70S6K, exceptuando en el caso de PIK, el cual no afectó al estado de activación de p70S6K tras 1 hora de tratamiento y, sin embargo, sí que inhibió a ésta tras 48 horas de tratamiento. Además, los tratamientos realizados con los inhibidores Ly y TGX también provocaron un aumento en la activación de la proteína Erk tras 48 horas de tratamiento.

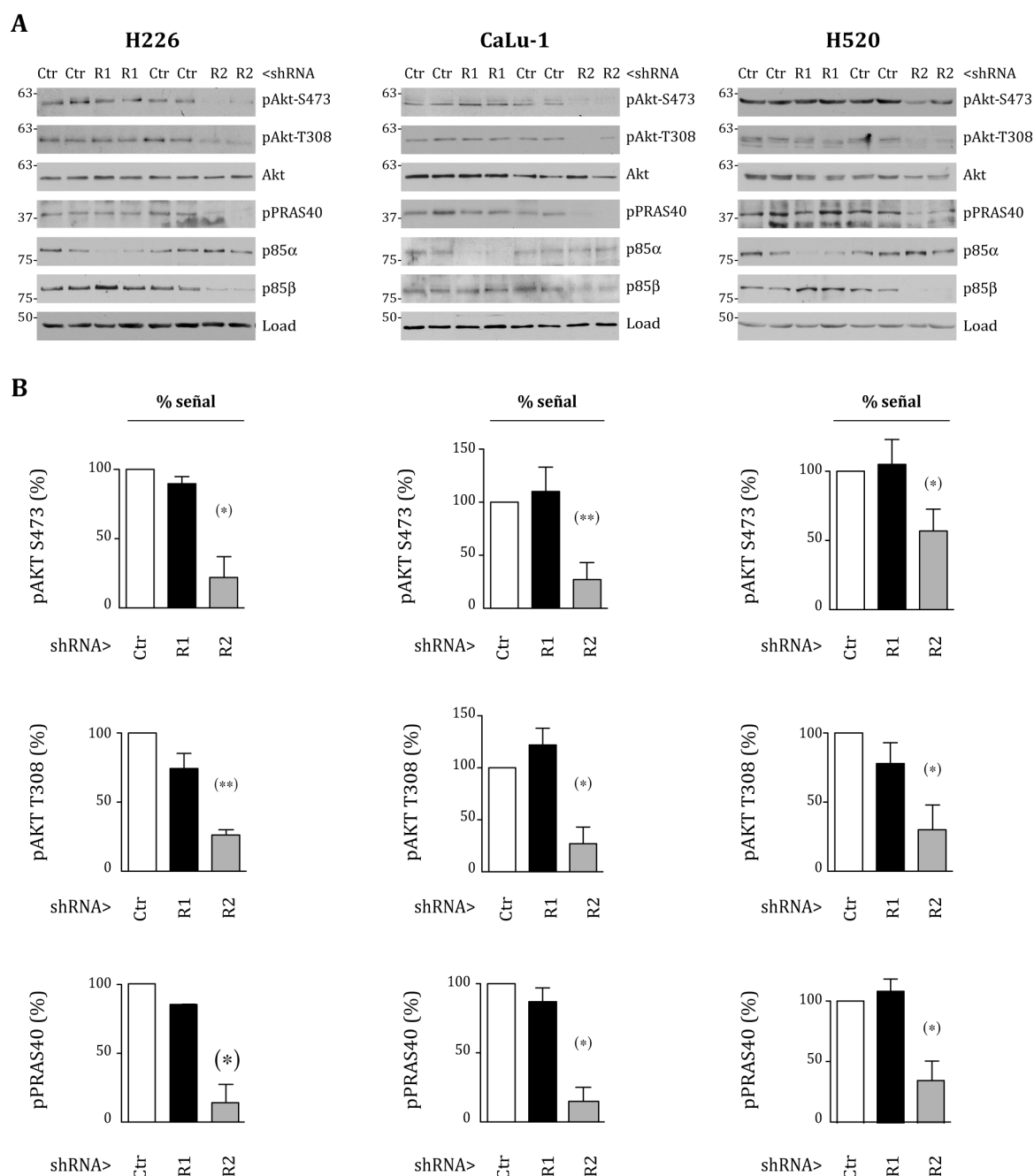


Figura 27.- *In vivo* la ruta de PI3K se mantiene inactiva tras silenciar p85β. (A) Análisis del estado de activación de la ruta PI3K en los tumores obtenidos de los ensayos *in vivo* silenciando p85α o p85β. Los niveles de activación de Akt y PRAS40 fueron analizados por *WB* (B) Estado de activación medio de Akt y PRAS40 en los tumores.

Por último, en el caso de las células H520, todos los tratamientos produjeron una clara reactivación en ambas fosforilaciones de Akt, en p70S6K y en Erk. En el caso de PRAS40, se produjo un leve aumento de la fosforilación tras 48 horas de tratamiento con los inhibidores PIK y TGX por separado, pero no tras el uso conjunto de ambos.

Los estudios *in vitro* demostraron, de manera global, que el uso continuado (48 horas) de los diferentes inhibidores relacionados con la ruta de PI3K provocan una reactivación de la misma en las líneas celulares estudiadas.

Para trasladar nuestros resultados a los modelos *in vivo*, se analizaron los efectores de la ruta de PI3K Akt y PRAS40 en las muestras de los tumores procedentes de los experimentos de xenógrafos. Esto permitió comprobar el estado de activación de las diferentes proteínas de la ruta tras el tratamiento con los agentes interferentes de ambas isoformas de p85 en tiempos prolongados. En los ensayos *in vitro* realizados con las tres líneas celulares (H226, CaLu-1 y H520) se observaron resultados similares. En el caso de los tumores tratados con el shRNA-*PIK3R2*, las proteínas Akt y PRAS40 se mantuvieron inhibidas tras el tratamiento prolongado (15 días aproximadamente), mientras que en los grupo de shRNA control y shRNA-*PIK3R1*, la ruta no se encontraba afectada (**Figura 27**).

En conjunto, todos estos datos confirman que el silenciamiento de p85 β no presenta los problemas de los inhibidores con respecto a la reactivación de la ruta de PI3K. Estos datos apoyan la hipótesis de que el silenciamiento de p85 β en los tumores de cáncer de células escamosas de pulmón provoca la inhibición mantenida de la ruta de PI3K, mientras que el uso de diferentes inhibidores provoca la momentánea inhibición de la ruta, pero una posterior reactivación de la vía de PI3K.

8.- Diferencias en proteínas asociadas a p85 α y p85 β

8.1. Diferencias en secuencia entre p85 α y p85 β

Las subunidades reguladoras p85 α y p85 β se expresan en todas las células. En células no tumorales, la isoforma p85 α presenta unos niveles de expresión mayores que los de p85 β [29]. En el caso de algunos tipos tumorales, como son el cáncer de mama, colon y carcinoma de células escamosas de pulmón, se ha demostrado que se produce un cambio en los niveles de expresión de ambas isoformas, aumentando los niveles de p85 β y reduciéndose los niveles de p85 α [77], lo que contribuye a la progresión tumoral. En

vista de los resultados obtenidos, que muestran la importancia de la isoforma p85β de manera específica en el mantenimiento y la progresión tumoral, se decidió estudiar las diferencias entre las proteínas asociadas en los complejos que contenían p85α o p85β.

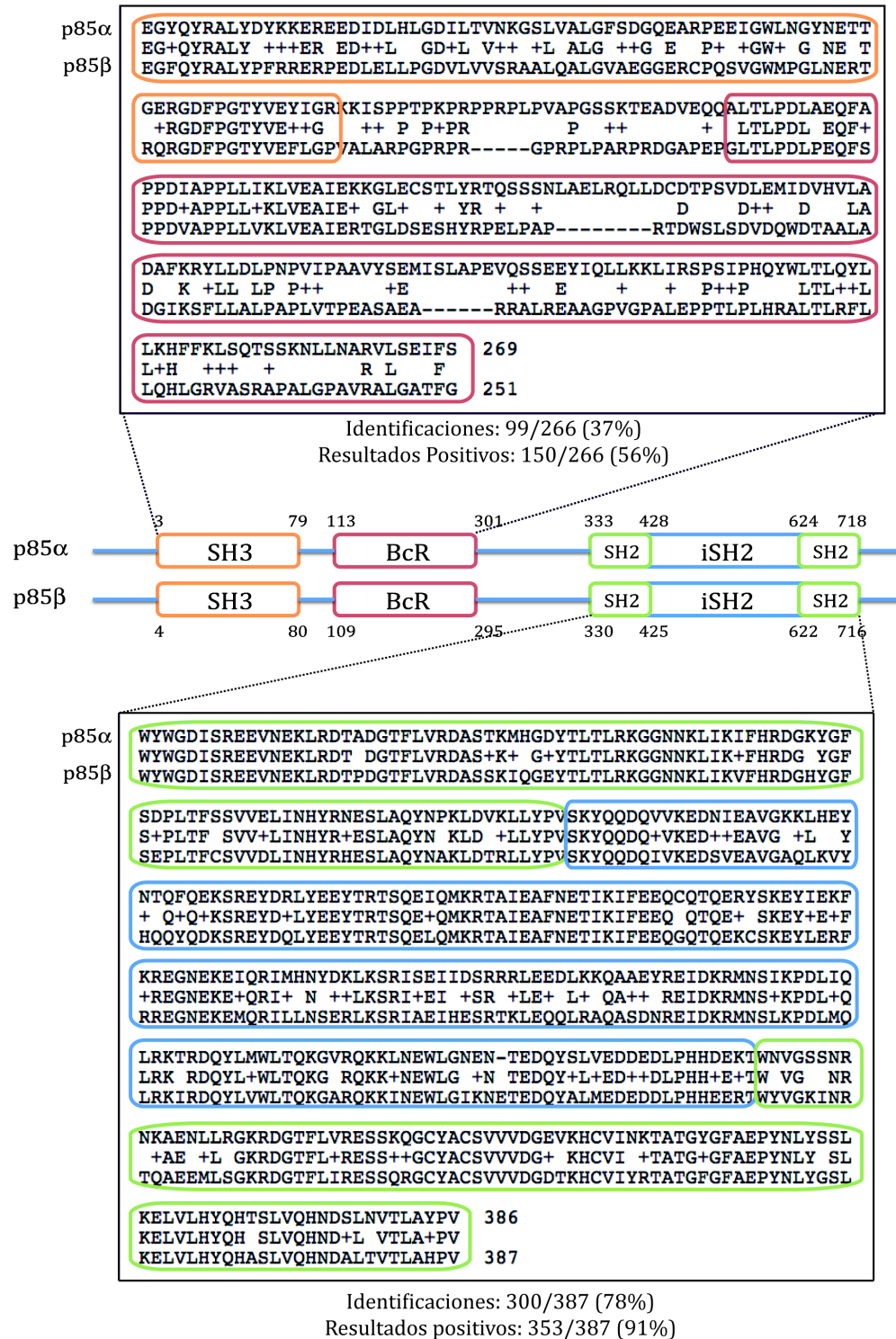


Figura 28.- Diferencias de secuencia entre las isoformas de p85.

Las isoformas p85 α y p85 β están codificadas por diferentes genes (*PIK3R1* y *PIK3R2*, respectivamente). Ambas isoformas tienen los mismos dominios, y una alta homología de secuencia entre ellas (58% del total). La región C-terminal de p85, que está formada por los dominios nSH2-interSH2-cSH2, es la región por la que p85 se une a la subunidad catalítica p110 [26]. Estos dominios se encuentran muy conservados entre ambas isoformas, presentando una identidad de secuencia del 78%. De hecho, si se considerasen como homólogos los aminoácidos de misma carga y estructura similar, el porcentaje aumentaría hasta el 91%. La región N-terminal, que comprende los dominios SH3 y BcR, tiene un porcentaje de homología muy inferior, de apenas un 37% (**Figura 28**). Por tanto, ésta podría ser la región en la que se produjesen las diferentes interacciones, específicas de cada isoforma, que explicasen el distinto comportamiento de p85 α y p85 β . Sin embargo, recientemente se ha descrito que, comparando la función específica de los dominios de p85 α y p85 β en la activación de PI3K, son los dominios del extremo C-terminal, y más en concreto el dominio cSH2, el que tiene una distinta función [79]. En el caso de p85 β , la eliminación del dominio cSH2 provocaba una inhibición de la actividad de PI3K, mientras que el mismo procedimiento en p85 α favorecía una mayor activación de PI3K.

8.2. Ensayo de *Pull Down*

Para estudiar las posibles interacciones específicas de cada isoforma de p85, se realizó ensayos de *Pull Down*. Para ello, se usaron células COS-7 transfectadas con los diferentes plásmidos para sobreexpresar las isoformas de p85 y de p110 (alfa o beta). La naturaleza de las proteínas asociadas a cada complejo se evaluó en colaboración con el Servicio de Proteómica del CNB, realizando un estudio combinado de cromatografía líquida y de espectrometría de masas (LC-MS/MS) [110] (**Figura 29**). Los resultados obtenidos fueron comparados entre los 4 complejos formados, con el fin de obtener resultados comunes de complejos formados por una misma subunidad [84].

Ante la gran cantidad de identificaciones obtenidas, y para dar una mayor solidez estadística a los resultados obtenidos, se calculó una tasa de falsos positivos (FDR), y se seleccionaron aquellos resultados cuyo FDR era menor del 1% para hacer una primera selección. A continuación, se realizó un segundo cribado del total de datos en base a un criterio llamado *Protein score*. El *Protein score* se obtuvo de la relación entre el número de péptidos identificados y el porcentaje de la secuencia total de la proteína en la que

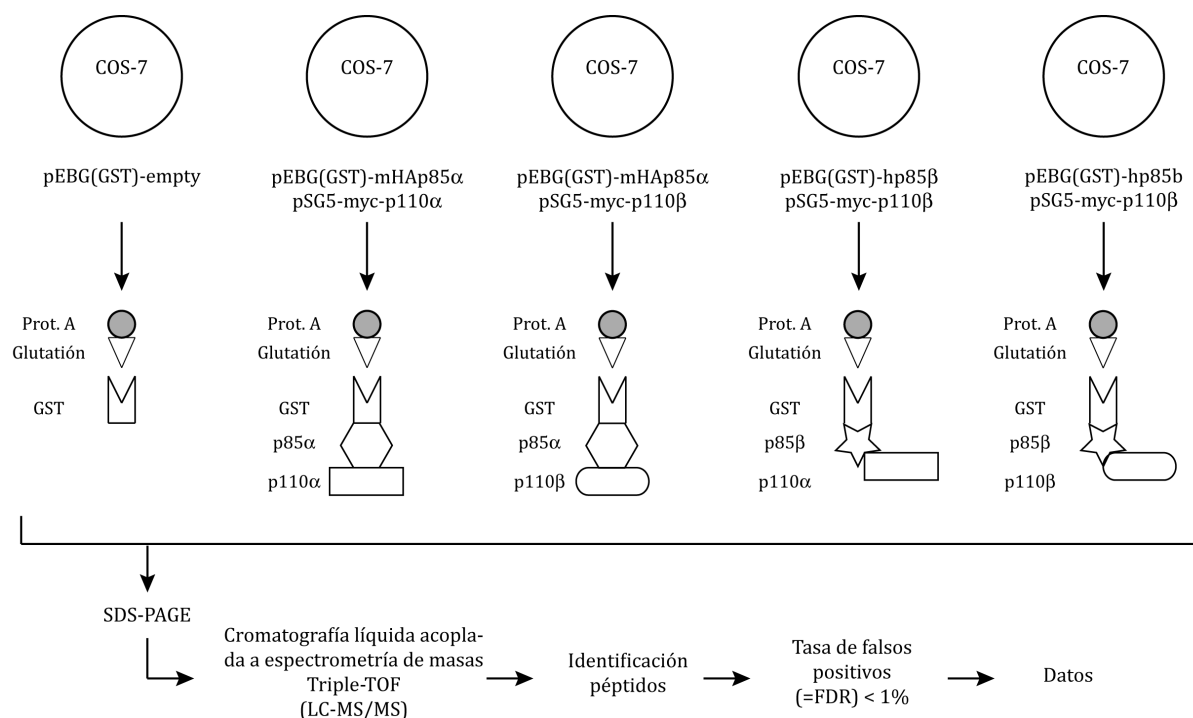


Figura 29.- Esquema de la estrategia de trabajo para la realización de los experimentos de *Pull Down*.

coinciden dichos péptidos. Se seleccionaron los datos que tenían un *Protein score* mayor o igual a 40. Una vez aplicados estos primeros criterios de selección, se obtuvieron más de 5.000 identificaciones positivas en total (**Figura 30A**).

8.3. Validación de dianas del *Pull Down*

En vista del alto número de identificaciones obtenidas tras el primer cribado, se decidió acotar la búsqueda de posibles dianas en base al número de péptidos identificados en las diferentes condiciones. Para ello, se restó el número de identificaciones de la condición de análisis y las obtenidas en el control negativo -el vector vacío sólo con GST-, descartando las dianas cuyo resultado fuera menor o igual a 1. Posteriormente, se determinó qué porcentaje de péptidos identificados son específicos de PI3K frente al control negativo. Sólo se consideraron aquellas dianas en las que la fracción de péptidos específicos de PI3K, respecto al control, fuera mayor del 50%. Tras este segundo cribado de los datos, sorprendentemente, los resultados obtenidos en cada uno de los complejos era de entre 150 y 180 proteínas, excepto en el complejo p85β/p110β, donde se identificaron 485 proteínas distintas (**Figura 30B**) [84]. En vista de los resultados obtenidos previamente, se trató de corroborar posibles candidatos de interés de entre

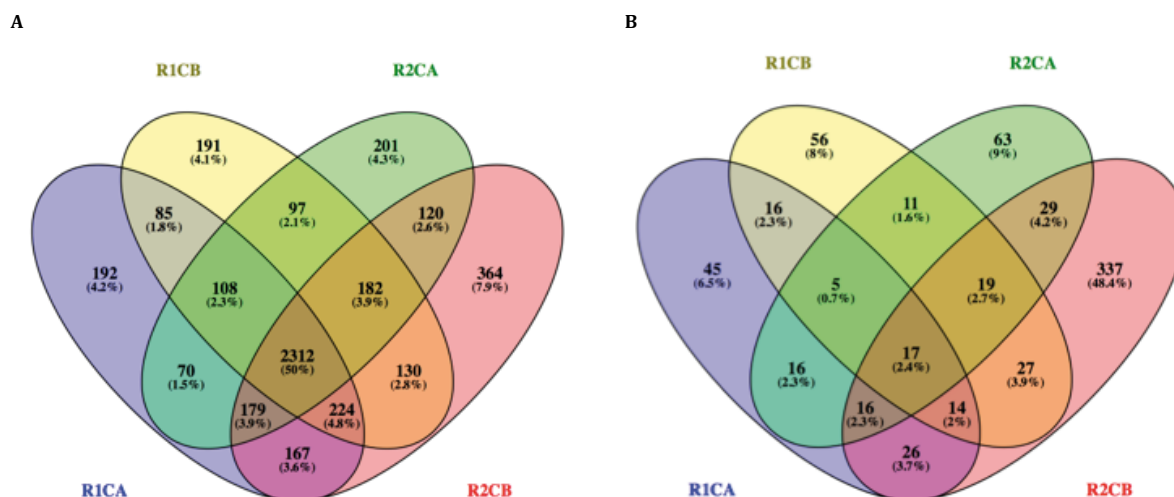


Figura 30.- Diagrama Venny de los resultados obtenidos en cada uno de los complejos. (A) Número total de identificaciones obtenidas en cada condición. **(B)** Número total de identificaciones obtenidas en cada condición, tras aplicar los diferentes filtros. R1CA = p85 α /p110 α ; R2CA = p85 β /p110 α ; R1CB = p85 α /p110 β ; R2CB = p85 β /p110 β .

los resultados obtenidos de manera específica en los complejos que estaban formados por la subunidad p85 β . En este caso, se analizaron las identificaciones detectadas en los complejos p85 β /p110 α y p85 β /p110 β (R2CA y R2CB, respectivamente), tanto de manera específica en cada uno de ellos como en ambos complejos. En total, se detectaron un total de 429 proteínas de manera específica en alguno de los complejos formados por p85 β . Estas proteínas resultantes se encuentran implicadas en

Número de proteínas por cada proceso biológico determinado

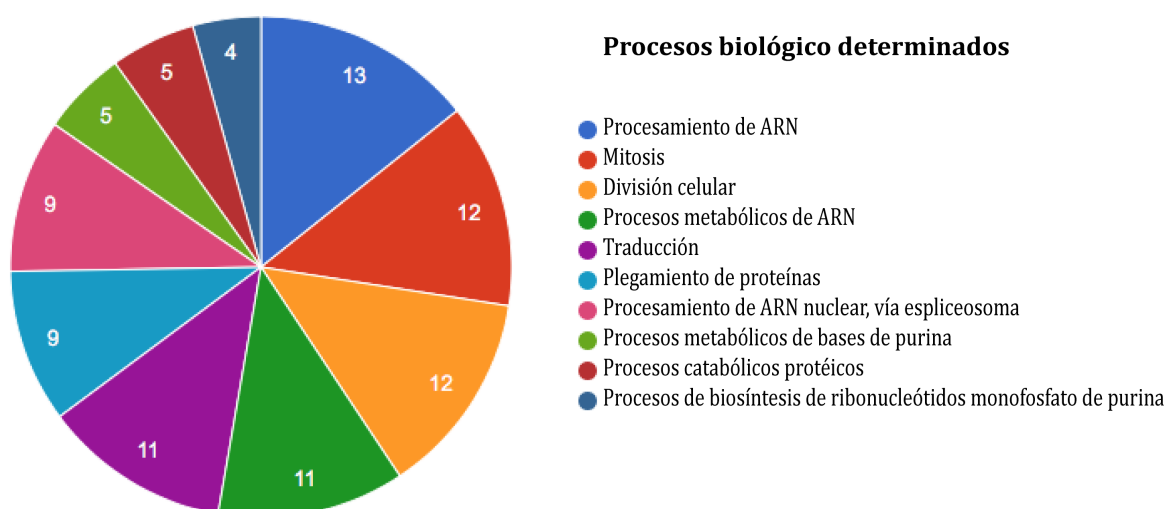


Figura 31.- Gráfico que muestra los procesos biológicos más representados por el total de proteínas detectadas en los complejos en los que se encuentra p85 β . En la gráfica se representan los principales procesos biológicos, con un p-valor menor de 0,005.

funciones muy diversas y distintas localizaciones celulares, por lo que se decidió utilizar un software para clasificarlas en base a los procesos biológicos en los que participa cada una, y así poder dividir las 429 proteínas detectadas en subconjuntos de proteínas que participen en los mismos procesos biológicos. Esta nueva clasificación permitió determinar en qué procesos celulares participan, de manera más concreta, las proteínas que se unen, o forman complejos, con los heterodímeros de PI3K que tienen como subunidad reguladora la proteína p85 β (**Figura 31**). Como era de esperar, los resultados apuntaban en muchos casos a una serie de procesos biológicos que se producen en el núcleo, donde se encuentra en mayor proporción la isoforma p110 β [111]. De entre todos ellos, se eligieron una serie de dianas candidatas para su validación (**Tabla 1**).

Nombre	Descripción	GST	R1CA	R1CB	R2CA	R2CB
PIK3CB	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform	2	2	16	-	27
PIK3R2	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta	4	7	3	24	26
COPA	Coatamer subunit alpha	10	16	14	16	20
EEA1	Early endosome antigen 1	3	2	7	3	11
CALR	Calreticulin	6	10	7	7	14
GMP5	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	6	10	11	10	14
POTEE	POTE ankyrin domain family member E	-	9	5	5	7
TLN2	Talin-2	2	5	2	5	9
TPR	Nucleoprotein TPR	4	4	6	16	11
GLG1	Golgi apparatus protein 1	4	7	6	8	10
TCEA1	Transcription elongation factor A protein 1	5	7	5	5	11
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5	5	7	6	8	11
DPP3	Dipeptidyl peptidase 3	6	9	8	7	12
UBE2NL	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like	-	3	-	2	5
KRT80	Keratin, type II cytoskeletal 80	-	1	-	1	5
RPS4Y2	40S ribosomal protein S4, Y isoform 2	-	-	-	-	5
PSME1	Proteasome activator complex subunit 1	2	5	4	4	7
HNRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	4	6	8	6	9
RBBP7	Histone-binding protein RBBP7	4	4	4	2	9
DDX39A	ATP-dependent RNA helicase DDX39A	-	4	4	4	4

Nombre	Descripción	GST	R1CA	R1CB	R2CA	R2CB
HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A-30 alpha chain	-	2	2	-	4
PPP2CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	-	3	2	1	4
EIF5AL1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like	-	3	-	2	4
RAB11FIP1	Rab11 family-interacting protein 1	-	1	3	2	4
CNPY3	Protein canopy homolog 3	-	1	2	-	4
TNPO2	Transportin-2 OS=Homo sapiens	1	2	1	2	5
HP1BP3	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	2	2	5	3	6
TBC1D5	TBC1 domain family member 5	2	1	2	2	6
DNAJB1	DnaJ homolog subfamily B member 1	2	2	3	2	6
MYO9B	Unconventional myosin-IXb	2	5	2	5	6
POLA1	DNA polymerase alpha catalytic subunit	3	5	2	3	7
DSG1	Desmoglein-1	3	1	2	4	7
CNOT1	CCR4-NOT transcription complex subunit. 1	3	2	3	4	7
PSMC6	26S protease regulatory subunit 10B	4	5	5	6	8
FAM129B	Niban-like protein 1	4	6	5	7	8

Tabla 1.- Listado de proteínas, tras el filtrado de los datos, con mayor número de péptidos identificados en el complejo R2CB. Lista de proteínas con una diferencia de péptidos entre el complejo R2CB y el control GST de mayor o igual a 4. GST = GST vacío; R1CA = p85 α /p110 α ; R2CA = p85 β /p110 α ; R1CB = p85 α /p110 β ; R2CB = p85 β /p110 β .

Los dos primeros candidatos que aparecieron en la lista de proteínas fueron p85 β y p110 β , que forman el heterodímero por el que se ha realizado la clasificación. De entre todos los posibles candidatos detectados, se eligieron varios candidatos de interés, y se validaron mediante ensayos de inmunoprecipitación (IP).

Una de las proteínas que aparecieron en los resultados, con un mayor número de péptidos identificados, fue la proteína Tpr, con 16 y 11 péptidos identificados en los complejos p85 β /p110 α y p85 β /p110 β , respectivamente. La proteína Tpr se encuentra formando parte del complejo del poro nuclear, en concreto se encuentra en la región distal de la cesta que se forma en la región nuclear, y participa en diversas funciones en el núcleo, como son el transporte de proteínas y ARNm entre el núcleo y el citosol, así como en el procesamiento de ARN o en la mitosis [112–115].

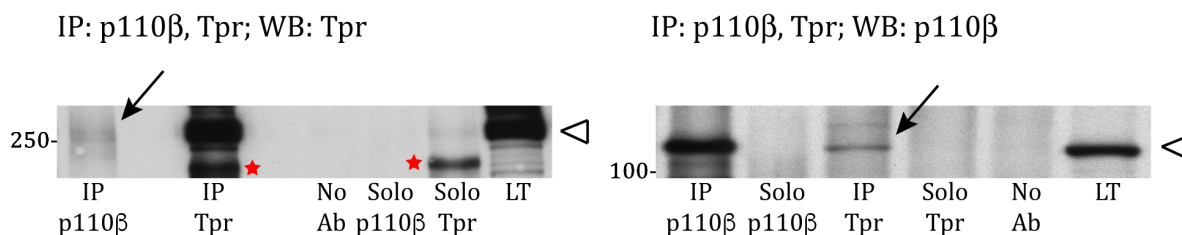


Figura 32.- Confirmación de la interacción entre Tpr y p110β. Inmunoprecipitación de lisados nucleares de U2Os (1 mg) con anticuerpos anti-Tpr y anti-p110β, y posterior análisis de las proteínas asociadas mediante WB con anticuerpos anti-Tpr y anti-p110β. LT = Lisado Total. La estrella roja indica la banda correspondiente a una señal inespecífica del anticuerpo.

Para determinar si la interacción con p85β o p110β es real, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en células U2Os. Para ello, se aislaron los núcleos de las células, se lisaron y se realizaron las IPs (**Figura 32**). La interacción entre Tpr con la enzima PI3K se pudo validar por medio de la proteína p110β. La confirmación de esta nueva interacción permitió, en primer lugar, validar nuestro experimento de *Pull Down*.

Además, abre nuevas vías de estudio sobre los mecanismos de control durante la mitosis, por medio de la proteína Tpr y la PI3K, o sobre el mecanismo de acción del procesamiento del ARN donde también participa la enzima PI3K [116]. Para darle mayor consistencia a los resultados de proteómica, se decidió validar la diana WRNIP1 (del inglés *Werner interacting protein 1*), también llamado WHIP, que fue identificada con únicamente 2 péptidos en el complejo de p85β/p110β. La proteína WHIP está implicada en procesos de reparación del ADN, en los que también se ha descrito que la participación de PI3K es importante [117], siendo posible que la interacción, en este caso entre p110β y WHIP, pudiese ser real. Al igual que con la proteína anterior, se realizaron IPs, con anticuerpos que reconocen p85 total o p110β con lisados nucleares de células U2Os. En el caso de p110β no se determinó la interacción, mientras que en el caso de p85 sí se observó una clara identificación de la proteína WHIP (**Figura 33**). Se hicieron los experimentos complementarios, inmunoprecipitando la proteína WHIP, para determinar si había co-inmunoprecipitado con p110β y p85. En efecto, se comprobó que el p85 nuclear interacciona con WHIP, y además, que ésta proteína también interaccionaba con p110β. En el caso de p110β, esta interacción fue analizada con 3 anticuerpos anti-WHIP, que reconocen diferentes regiones de la proteína: la

región N-terminal (1-27 aminoácidos), una región intermedia (400-450 aminoácidos) y el extremo C-terminal (633-658 aminoácidos).

Tras realizar varias IPs con los tres anticuerpos, se determinó que la interacción era detectable cuando se utilizaban los anticuerpos que reconocen los extremos N- y C-terminal, mientras que, con el anticuerpo que reconoce la región intermedia, en ningún caso se pudo observar la interacción. También se comprobó que la proteína WHIP es capaz de unir p85 únicamente cuando se inmunoprecipitaba desde el extremo C-terminal de WHIP, indicando una posible interacción con p85 a través del extremo N-terminal (donde hay un dominio UBZ *-zinc finger-*).

Estos datos demuestran la interacción entre las proteínas WHIP y ambas subunidades de PI3K (p85 y p110 β nuclear), y apoyan la idea de que la interacción WHIP-p110 β pudiera ser a través de la región de WHIP situada entre los aminoácidos 400 y 450.

Finalmente, se decidió buscar una tercera diana que, aunque hubiera sido identificada en el *Pull down*, no hubiera pasado todos los filtros de selección, tratando con ello de demostrar lo restrictivo que ha sido el filtrado de los datos. En este caso, un posible candidato de interés es la proteína lamina A/C, cuya interacción con PI3K no ha sido descrita hasta ahora, pero sí ha sido relacionada con la ruta de PI3K [118]. Esta posible interacción podría ayudar a explicar cómo actúa p110 β en el núcleo, de manera

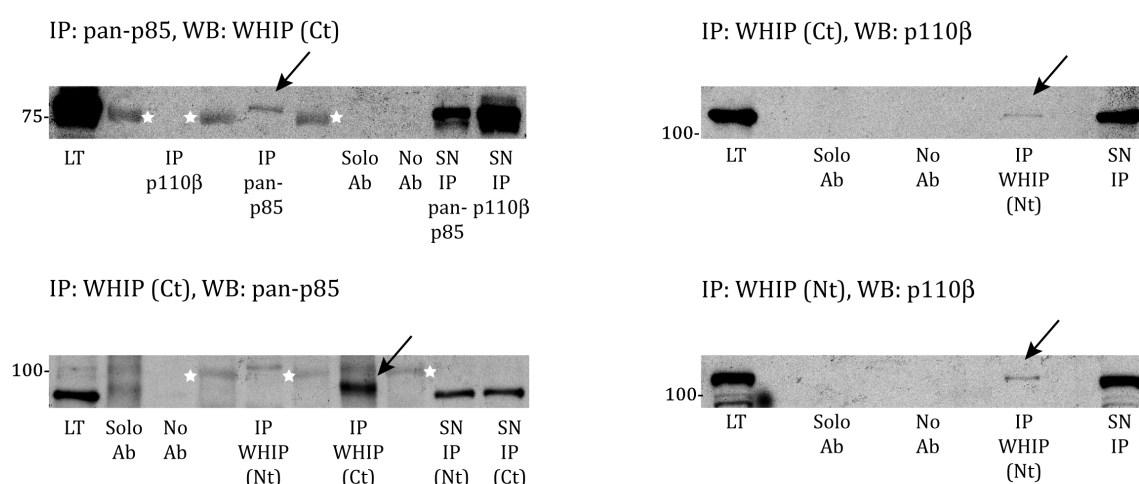


Figura 33.- WHIP interacciona con p110b y p85. Inmunoprecipitación de lisados nucleares de U2Os (1 mg) con anticuerpos anti-WHIP, anti-p110 β y anti-pan-p85, y posterior análisis de las proteínas asociadas mediante WB con anticuerpos anti-WHIP (Ct), anti-p110 β y anti-panp85. Nt = N-terminal, Ct = C-terminal, LT = Lisado Total. La estrella blanca indica la banda correspondiente al marcador de peso molecular.

dependiente o independiente de su actividad catalítica. Se realizaron las mismas aproximaciones que en los casos anteriores con Tpr y WHIP.

Tras los primeros ensayos de lisis celular, se comprobó que no era posible la extracción de la lamina A/C, ya que es uno de los componentes principales de la lámina nuclear, que forma parte de la envoltura nuclear, y se encuentra inmediatamente a continuación de la membrana nuclear, en contacto con ella. Por tanto, hizo falta realizar unas modificaciones en los tampones de lisis para extraer la lamina A/C de la envoltura nuclear y realizar los diferentes experimentos de IP (**Figura 34**).

En este caso, tras las diferentes aproximaciones, se pudo demostrar la interacción entre la lamina A/C y p110 β , únicamente cuando se inmunoprecipitaba con el anticuerpo que reconoce la lamina A/C, confirmando *in vitro* la interacción entre ambas proteínas.

Estos resultados han permitido, en primer lugar, demostrar la fiabilidad de los resultados obtenidos en el Pull Down. La validación de un candidato con un alto número de identificaciones positivas (Tpr), y otro con un bajo número de identificaciones pero que igualmente ha pasado los cribados de los datos (WRNIP1), dan consistencia al análisis de los datos, haciendo de todas las proteínas obtenidas, factibles dianas de interacción con los diferentes heterodímeros, para estudiar las funciones de la PI3K. La validación de la proteína lamina A/C, que también fue identificada en el Pull Down pero no pasó todos los filtros, demuestra que existen otras posibles dianas identificadas, con menor valor estadístico, pero igualmente reales.

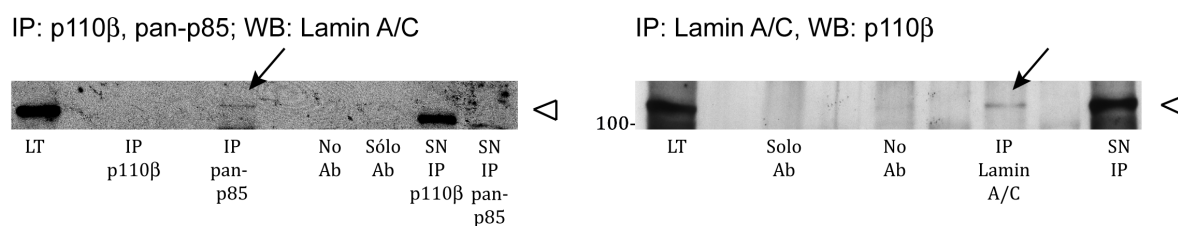


Figura 34.- La lamina A/C interacciona con p110 β y p85. Inmunoprecipitación de lisados nucleares de U20s (1 mg) con anticuerpos anti-lamina A/C, anti-panp85 y anti-p110 β , y posterior análisis de las proteínas asociadas mediante WB. LT = Lisado Total.

DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que tiene una mayor tasa de mortalidad en todo el mundo y, entre sus diferentes subtipos, el cáncer de células escamosas de pulmón (SqCLC) comprende aproximadamente la cuarta parte de todos los casos [5]. Actualmente no hay un tratamiento específico para este tipo de cáncer, por lo que, en estos pacientes, se sigue el tratamiento inespecífico de cirugía, quimioterapia y radioterapia. Por ello, existe una necesidad de buscar posibles biomarcadores moleculares específicos para estos casos, así como de nuevos tratamientos más específicos.

Con el desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, y el abaratamiento en los costes de éstas, se ha fomentado el análisis genómico de un amplio número de muestras oncológicas en los diferentes tipos de cáncer diagnosticados. Estas nuevas herramientas han permitido definir patrones de mutaciones presentes en cada conjunto de muestras de un mismo tipo tumoral. El cáncer de pulmón está caracterizado por ser el que tiene el mayor número de mutaciones por megabase de entre todos los tipos estudiados. En concreto, el cáncer de pulmón tiene un ratio de más de 8 mutaciones por cada megabase, en comparación con otros tipos de cáncer con ratios inferiores (entre 0,5 y 3 mutaciones por megabase), lo que implica una mayor alteración genética en los pacientes de cáncer de pulmón [8]. Además, se ha descrito que, en más de la mitad de cáncer de pulmón analizadas, había mutaciones de alguno de los biomarcadores relacionados con la enfermedad, como por ejemplo p53. En los casos de SqCLC se han detectado mutaciones en diferentes biomarcadores que pertenecen a la ruta de PI3K/Akt/mTOR, incluyendo mutaciones en los genes *PIK3CA* o *PTEN* [6]. Sin embargo, hay un gran número de pacientes que no tienen ninguna mutación conductora descrita en alguna de las vías abordables para un tratamiento, lo que impide el uso de terapias dirigidas.

En muchos casos, no solo las mutaciones puntuales son las responsables del desarrollo tumoral, sino que también se puede deber a modificaciones post-transcripcionales [119], post-traduccionales [120] o como producto de una alteración en el número de copias [121] o en la expresión de un gen. En el caso de las isoformas p85 α y p85 β , se ha demostrado que se produce un aumento de expresión de p85 β , al mismo tiempo que se reducen los niveles de p85 α (p85 β -p85 α “*isoform switch*”) en las células tumorales de

SqCLC (**Figura 10 y 11**), en comparación con las células no tumorales, las cuales presentan mayores niveles de p85 α que de p85 β .

En este trabajo, se propone el uso de agentes interferentes dirigidos contra la subunidad reguladora p85 β de la enzima PI3K como tratamiento para el cáncer de células escamosas de pulmón. Los resultados obtenidos demuestran que la interferencia de p85 β es un procedimiento que reduce los niveles de proliferación celular *in vitro* (**Figura 24**), además de ser capaz de revertir los tumores humanos generados en diferentes modelos *in vivo* (**Figura 18, 19 y 20**). En concreto, se ha demostrado que p85 β se podría utilizar como biomarcador para los casos de SqCLC, y que la eficacia del tratamiento de interferir p85 β puede ser dependiente del ratio entre los niveles de p85 β y p85 α en el tumor.

El mecanismo de activación de la ruta de PI3K involucra varios efectores bien descritos, que requieren de una activación secuencial para que, tras la correcta interacción de una señal extracelular con su receptor, se transmita la información al interior de la célula, y sea posible una respuesta celular. Uno de los efectores clave de la ruta de PI3K es la proteína Akt, la cual requiere la presencia de PI(3,4,5)P₃ en la membrana para poder unirse a este lípido, y ser fosforilada y activada localmente por la proteína PDK1 y, a continuación, por el complejo mTORC2. Los experimentos realizados en esta tesis confirman que tras la reducción de los niveles de p85 β , se produce un descenso de los niveles de activación de Akt y p70S6K, mientras que no hay cambios significativos tras reducir los niveles de expresión de p85 α (**Figura 12, 13 y 14**). Estas diferencias en el estado de activación de la ruta de PI3K, dependiendo de la isoforma de p85 que esté afectada, demuestran que la subunidad p85 β tiene una función específica en alguno de los procesos celulares en los que participa la enzima PI3K, en las líneas celulares de cáncer de células escamosas de pulmón.

Ambas isoformas tienen una parte de sus funciones solapantes, principalmente las relacionadas con los dominios nSH2-interSH2-cSH2, por lo que la ausencia de una de las dos isoformas es parcialmente compensada por la otra. Sin embargo, hay una serie de funciones propias de cada isoforma, sin la cual las respuestas celulares específicas se verían afectadas. De hecho, mientras que la subunidad p85 α funciona como un supresor tumoral, p85 β tiene una función promotora de progresión tumoral [77,122–124].

Al igual que la subunidad p85 α está implicada en la citocinesis [34], p85 β tiene una serie de funciones específicas descritas. De entre los diferentes procesos celulares en los que participa p85 β , se conoce su implicación en la formación de invadopodios y placas de adhesión en fibroblastos, favoreciendo la migración de células tumorales en melanoma [36], apoyando los datos que sugieren que p85 β también favorece la progresión tumoral. Sin embargo, la reducción de los niveles de p85 β en el SqCLC no afecta al estado de activación de la proteína FAK (**Figura 15**). En el caso contrario, tras la sobreexpresión de p85 β en fibroblastos, tampoco se ha observado una mayor actividad de FAK (**Figura 16**), lo que sugiere que la actividad de la proteína FAK, al menos en las células de SqCLC, no está afectada por el aumento de actividad de la enzima PI3K.

Muchos de los estudios realizados sobre la vía de PI3K están basados en el uso de inhibidores contra alguno de los componentes de la ruta de PI3K (p110, p85, Akt o mTOR) [74,76,108,109]. Uno de los principales problemas que está teniendo el uso de éstos inhibidores, que actualmente están en diferentes fases en los ensayos clínicos, es la reactivación de la ruta de PI3K tras un corto periodo de tiempo de tratamiento con el inhibidor, lo que finalmente provoca la suspensión del tratamiento al no observarse un efecto terapéutico. La reactivación de la ruta, tras el uso de los inhibidores, es una consecuencia de la alteración de alguno de sus mecanismos de regulación, ya sea el *feedback* negativo o mediante el aumento de los niveles de expresión de los receptores de membrana, debido al aumento de los factores de transcripción FOXO [50,106]. Otro problema de los inhibidores es que afectan a su diana en todas las células, por lo que el efecto deseado de reducir la actividad de la ruta de PI3K en las células tumorales también sucede en el resto de las células sanas del paciente, lo que provoca una serie de efectos secundarios. En el caso del SqCLC, el uso de diferentes inhibidores de la ruta de PI3K, a tiempos cortos (1 hora), provoca una disminución de la actividad de la ruta. Al igual que en otros tipos tumorales como el cáncer de mama [50], en el SqCLC se ha demostrado que los niveles de activación de Akt vuelven a su estado basal o incluso aumentan tras 48 horas de tratamiento de los inhibidores (**Figura 26**). De cualquier forma, los inhibidores no han demostrado ser capaces de regular la ruta a largo plazo. Por tanto, en la actualidad se están realizando nuevos ensayos clínicos con el uso combinado de dos inhibidores distintos [67], o con inhibidores duales de segunda generación [125,126].

En vista de los problemas que han demostrado tener estos inhibidores, se decidió investigar la utilización de agentes interferentes contra p85 β . Estos tienen la principal ventaja de que, al estar dirigidos específicamente contra p85 β , afectarán principalmente a las células tumorales, que tienen mayores niveles de esta isoforma, mientras que en las células no tumorales, que expresan mayores niveles de p85 α que de p85 β , no tendrá graves consecuencias, ya que la mayoría de las funciones serán realizadas por p85 α (**Figura 18 y 21**).

Los resultados obtenidos en los que se observaba que la reducción de la actividad de la ruta de PI3K tras el silenciamiento del gen *PIK3R2* se mantenía en el tiempo, junto con los datos de reactivación de la ruta con el uso de los inhibidores, han dado paso a realizar los experimentos para determinar la importancia de p85 β en modelos *in vivo*. En los ensayos de xenotrasplantes, se demuestra que el tratamiento con los agentes interferentes de p85 β es capaz de reducir el nivel de actividad de la ruta de PI3K, y mantener dicho estado de manera constante durante tratamientos de larga duración (**Figura 19**). Esta inhibición de la ruta, provoca una regresión tumoral que no se produce en el caso de los xenotrasplantes en los que se silenció la isoforma p85 α . El mantenimiento del estado inactivo de la ruta de PI3K de manera prolongada supone un importante avance en el campo, ya que consigue evitar los efectos de reactivación de la ruta, y provoca una reducción de los tumores de SqCLC (**Figura 18, 19 y 20**). Para confirmar la eficacia del silenciamiento de la subunidad p85 β a tiempos prolongados, se realizó un nuevo procedimiento en el que se silenció la proteína p85 β , y tras la remisión de los tumores, se retiró el tratamiento. Los resultados obtenidos confirman que, en aquellos tumores en los que la reducción de los niveles de p85 β se mantuvo disminuida, el tumor mantenía su regresión, mientras que los tumores que recuperaban los niveles de expresión originales de p85 β , se producía un aumento de la proliferación tumoral a niveles similares a los que presentaba al inicio del tratamiento (**Figura 23**).

Una posible explicación sobre el distinto comportamiento en el grupo de tumores a los que se le retiró el tratamiento y tuvo un crecimiento lento de los tumores, es que se hubiera producido una regresión total de los tumores durante el tratamiento. Dado el alto número de tipos celulares que se encuentran en todos los tumores, una vez retirado el tratamiento, el leve desarrollo de la masa tumoral podría ser debido, no tanto a las células tumorales, sino a otros tipos celulares encontrados en los tumores, como pueden

ser los adipocitos que se sitúan alrededor de ellos, o las células endoteliales encargadas de la angiogénesis tumoral. Otra posible explicación sería que, en algún momento durante el proceso de formación del tumor, o el periodo con el tratamiento, alguna de las células sufriera una mutación que le permitiese adaptarse al silenciamiento de p85 β .

Estos resultados confirman la implicación de la subunidad p85 β en la activación de la ruta de PI3K, y su función destacada en el mantenimiento y la proliferación tumoral en el cáncer de células escamosas de pulmón. En base a estas observaciones, se concluye que el aumento de p85 β es un fenotipo conductor o “*driver*”. Además, estos resultados están en concordancia con los obtenidos en el cáncer de mama y de colon [77]. Otros trabajos apoyan los resultados obtenidos en esta tesis: se ha descrito que p85 β tiene un papel oncogénico [77,122], y también que la proteína p85 α puede tener una función supresora de tumores, ya que tras reducir sus niveles aumentaba la proliferación celular [123,124].

Los resultados hacen de la aplicación de una terapia con agentes interferentes de p85 β en pacientes de SqCLC, un posible paso más en la lucha contra este tipo de cáncer. Una de las características del SqCLC es que, debido a su situación en los pulmones, podría ser tratado por vía aérea, de esa manera, todos los efectos derivados del tratamiento afectarían directamente a los pulmones. Por ello, el tratamiento por medio de un aerosol actuaría de manera directa en los pulmones. Este método tendría la ventaja, sobre otras formas posibles de tratamientos, en que evitaría que una parte del tratamiento pudiera ser absorbido por el resto de las células del cuerpo hasta llegar a su destino, perdiendo eficacia el tratamiento, o que pudiera ser eliminado del organismo antes de haber actuado. Además, también se evitarían los efectos secundarios que se producen en los órganos no dianas, como pueden ser los problemas que se observan con los inhibidores de PI3K en el metabolismo de la glucosa [68].

La implicación de p85 β en la progresión tumoral tiene que tener una base molecular. Por ello, se estudió la implicación de p85 β en la proliferación celular. Hay datos previos sobre la implicación de la enzima PI3K en el ciclo celular, haciendo referencia a la subunidad p110 tanto en la regulación del ciclo celular [34,81,127,128], como en los mecanismos de replicación y reparación del ADN [117,129,130], ambos procesos necesarios para la correcta progresión del ciclo celular.

El análisis histológico de las muestras tumorales obtenidas en los ensayos *in vivo* mostraron que, tras la reducción de p85 β , se produjo un descenso significativo de la proliferación celular [104], mientras que el silenciamiento de la subunidad p85 α no afectaba a las células (**Figura 22**). Además, en los estudios de pulso y caza realizados se determinó que en las células H226, que expresan niveles muy bajos de p85 α , la ausencia de p85 β provocaba que el ciclo celular se ralentizaba en fase G2/M, mientras que en las células CaLu-1, que expresan una cierta cantidad de p85 α , se producía un retraso fase S, aunque las células eran capaces, de manera más lenta, de terminar el ciclo y pasar a G0/G1 (**Figura 24**). Hasta ahora no había datos que correlacionaran de manera directa a la subunidad reguladora p85 β y la progresión del ciclo celular en células diferenciadas; sólo hay un trabajo que demuestra la implicación de Akt1 y p85 en la proliferación y la auto-renovación (*self-renewal*) de las células madre de cáncer de pulmón, aunque sin valorar el papel de las distintas isoformas de p85 [131].

Los datos presentados demuestran la importancia de que haya unos niveles mínimos de p85 en la célula, para que el ciclo celular pueda progresar, poniendo de manifiesto la importancia de esta subunidad reguladora en el ciclo celular –principalmente durante las fases S y G2/M-, y su posible participación, de manera independiente o junto a la subunidad p110, en alguna de las diferentes fases de la mitosis.

Para poder explicar la función de p85 β en el ciclo celular, es necesario conocer de forma precisa cómo actúa, siendo plausible que su función específica sea a través de interacciones con distintas proteínas. Esta posibilidad se exploró con el análisis del interactoma de las diferentes isoformas reguladoras p85 α y p85 β (**Figura 30**). Los datos de proteómica indican que la mitosis y el ciclo celular son procesos biológicos en los que participan los heterodímeros en los que se encuentra p85 β (**Figura 31**), por lo que la proteína Tpr, que forma parte del complejo del poro nuclear, y está relacionada con la mitosis y el procesamiento de ARN, sería una posible diana del complejo p85 β /p110 β [113,114,132]. La interacción p110 β -Tpr confirma, de manera aún más concreta, la relación entre la enzima PI3K, el complejo del poro nuclear (NPC) y la envoltura nuclear [133]. Este resultado ha permitido validar los experimentos de proteómica y, además, también abre una serie de nuevas posibilidades para seguir investigando (**Figura 32**).

Otro posible candidato obtenido de los resultados de proteómica es la proteína Anapc7 (del inglés *Anaphase—promoting complex subunit 7*), que se une de manera específica al

complejo formado por p85 β /p110 β (R2CB = 2 péptidos identificados). La proteína Anapc7 es una proteína del tipo ubiquitina E3 ligasa, y forma parte del complejo promotor de la anafase (APC/C), que controla la progresión de la mitosis. Se sabe que las proteínas p85 y PTEN se unen de manera directa [40], y también, que la proteína PTEN, en el núcleo, es capaz de unirse a 4 proteínas que forman parte del APC/C, una de las cuales es la proteína Apc7 [134]. Por tanto, sería muy interesante el estudio de la relación entre la subunidad reguladora p85 β y la proteína Anapc7 durante la mitosis,

Aunque la función celular más importante de la enzima PI3K es la fosforilación de fosfoinosítidos (PI) en la membrana plasmática, se conocen otras funciones de algunas isoformas de PI3K independientes de su actividad catalítica. Así, se sabe que p110 β tiene un papel fundamental en la replicación del ADN, siendo necesaria su participación en la unión de la proteína PCNA a la cromatina, previo paso a la formación de los anillos de replicación [130]. Además, p110 β también tiene una función importante en la reparación del ADN, por medio de la regulación de la proteína Nbs1, que es capaz de detectar roturas en el ADN de cadena doble, para su posterior reparación [117]. En este sentido, adquiere especial relevancia la interacción entre la proteína WRNIP1 (*Werner-interacting protein 1*, también llamada WHIP, *Werner Helicase Interacting Protein*) y las subunidades p85 y p110 β demostradas en este trabajo (**Figura 33**). WRNIP1 es una proteína que actúa en procesos de reparación del ADN tras un estrés replicativo, por medio de la señalización de ATM [135], y podría contribuir a la explicación de cómo p110 β actúa en los procesos de reparación de ADN.

La enzima PI3K es también una quinasa ineficiente de proteínas, y refiere como sustrato a la proteína Akt, que permitiría la activación directa por medio de p110 [25]. Este mecanismo de activación de Akt podría explicar cómo puede actuar Akt en aquellas localizaciones celulares en las que no fuera posible el mecanismo de activación canónico por medio de PIP₃, PDK1 y mTORC2. La formación de complejos en el citoplasma abre la posibilidad de pensar en ellos también en el núcleo. Se conoce la presencia de los fosfoinosítidos en la membrana nuclear, y sus diferentes implicaciones en procesos biológicos como la mitosis [136]. Está demostrado que en los gránulos de intercromatina o *nuclear speckles* (dominios nucleares enriquecidos en factores de procesamiento de ARNm, localizados en regiones intercromosómicas del nucleoplasma de células de mamíferos) hay una cantidad de fosfoinosítidos distribuidos en diferentes

proporciones, estando principalmente PI(4,5)P₂ en los gránulos de intercromatina [137], y PI(3,4,5)P₃ en la matriz nuclear alrededor de éstos [138]. La distribución asimétrica de los fosfoinosítidos puede relacionarse con funciones específicas, de distintas proteínas, dentro del núcleo. Una de las isoformas que podría generar el PI(3,4,5)P₃ nuclear sería el complejo formado por las subunidades p85β y p110β, ya que es el principal heterodímero nuclear de PI3K. Sin embargo, las localizaciones nucleares de p110β, que han sido investigadas por inmunofluorescencias (datos no mostrados), no concuerdan con la estructura de estos gránulos de intercromatina, aunque no se puede descartar que parte del contenido de p110β del núcleo esté presente en dichas regiones. En este caso, la presencia mayoritaria de p85β en el núcleo permite hipotetizar acerca de posibles complejos intranucleares p85β-p110β y relacionarlos con la activación de Akt nuclear, la producción de PI(3,4,5)P₃ en la matriz nuclear, o su implicación en la regulación del procesamiento alternativo del ARN [139].

En el campo de estudio del núcleo hay muchos trabajos relativos a su composición: las proteínas que contiene, su estructura y complejidad, así como la estructura de la cromatina y la expresión génica. También se ha estudiado el papel de PI3K, y algunos efectores de la ruta, en diferentes eventos nucleares, como la replicación y reparación de ADN, por ello la interacción p110β-WRNIP1 tiene especial importancia en este punto (**Figura 33**). Recientemente se ha descrito la función de Akt en la fosforilación de unas proteínas de la lámina nuclear, llamadas lamina A/C, que forman filamentos intermedios que están implicadas tanto en la estructura de la envoltura nuclear y la rigidez del núcleo, como en la estructura de la cromatina y el anclaje de ésta a la lámina nuclear [140]. Esta nueva función descrita de Akt sugiere su implicación en el proceso de formación y desorganización de la lámina nuclear, donde es necesaria la fosforilación de las laminas para desorganizar la envoltura nuclear como paso previo a la división celular.

Hay varios trabajos que relacionan a la enzima PI3K con la lamina A/C [118,141], y con la integridad de la envoltura nuclear [133]. Sin embargo, no existen datos previos sobre la posible implicación coordinada entre la PI3K y la lámina nuclear en funciones conjuntas. En los últimos años, se ha demostrado la existencia de una pequeña proporción de lamina A/C soluble en el nucleoplasma, y se ha especulado sobre su posible función [142], sugiriendo la posibilidad de servir como puntos de unión a la

cromatina, en donde se reclutarían los complejos de replicación, y servirían para estabilizar dichos complejos y garantizar una correcta replicación. Por todo ello, y dado que se conoce la implicación de p110 β en la progresión del ciclo celular, y la importancia de p85 al final de la mitosis (**Figura 24**), se decidió estudiar la posible interacción entre la enzima PI3K y la lamina A/C. La confirmación de las interacciones p110 β -lamina A/C, p85-lamina A/C (**Figura 34**) y p110 β -WRNIP1 (**Figura 33**) permitirá seguir desarrollando diferentes proyectos en el laboratorio, como por ejemplo el estudio de las posibles implicaciones de la enzima PI3K en enfermedades relacionadas con la envoltura nuclear, como la Progeria (También llamada Síndrome de Hutchinson-Gilford) que se produce como consecuencia de una mutación en la lamina A/C, o el Síndrome de Werner (Progeria adulta), como consecuencia de la mutación en la proteína con actividad helicasa de ARN llamada Wrn (*Werner protein*).

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis muestran, por primera vez, la utilidad terapéutica de interferir la acción de p85 β en tumores humanos ya establecidos que tienen una sobreexpresión de esta isoforma en el curso de su progresión, utilizando como modelo el carcinoma de células escamosas de pulmón, para el que no existen, hasta la fecha, terapias específicas. Atendiendo a la definición de mutaciones “*driver*” (esenciales para la adquisición del fenotipo tumoral y su mantenimiento), podemos considerar el aumento de expresión de p85 β en tumores de células escamosas de pulmón como una desregulación de expresión génica “*driver*”. Estos resultados apoyan el posible uso, en la práctica clínica, del ratio p85 β /p85 α como posible indicador de la eficacia que tendría el tratamiento con agentes interferentes contra la proteína p85 β . Asimismo, estos resultados abren la puerta a futuros estudios basados en las funciones específicas de las isoformas de la subunidad reguladora p85. En el campo de la investigación oncológica, futuros trabajos podrían estar dirigidos hacia el estudio del mecanismo molecular que provoca que p85 β , de manera específica, sea uno de los principales factores en el aumento de la proliferación celular y la progresión tumoral, así como de estrategias alternativas con el fin de interferir la acción de p85 β .

CONCLUSIONES

- 1.- La subunidad reguladora p85 β está sobreexpresada en el 80% de las líneas celulares de cáncer de células escamosas de pulmón (SqCLC) estudiadas.
- 2.- La sobreexpresión de p85 β provoca un aumento de la actividad de la ruta de PI3K, mientras que no afecta a la activación de la proteína FAK, en las líneas celulares de SqCLC.
- 3.- El silenciamiento de p85 β –y no de p85 α – provoca la regresión de los tumores en los modelos *in vivo* generados con las líneas celulares de SqCLC.
- 4.- Existe una correlación directa entre el ratio de los niveles de expresión de p85 β y p85 α , y la eficacia del tratamiento con agentes interferentes dirigidos contra p85 β .
- 5.- La reducción de los niveles de p85 β en SqCLC dificulta la proliferación celular *in vitro*, provocando una ralentización del ciclo celular. Es necesaria una cantidad mínima de p85 total para que el ciclo celular pueda progresar correctamente.
- 6.- El silenciamiento de p85 β , a diferencia del uso de los inhibidores, impide que se produzca una posterior reactivación de la ruta PI3K, manteniéndola inactiva durante un tratamiento prolongado.
- 7.- Los diferentes heterodímeros de PI3K interaccionan, de manera específica, con diferentes proteínas. Esto permite que, en función del heterodímero, la enzima PI3K actúe de una manera específica, participando en procesos biológicos distintos.

ANEXOS

Durante la realización de esta tesis doctoral he participado en diferentes proyectos que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Artículos relacionados con la tesis doctoral:

Vallejo-Díaz J, Olazabal-Morán M, Cariaga-Martínez AE, Pajares MJ, Flores JM, Pio R, Montuenga LM, Carrera AC. *Targeted depletion of PIK3R2 induces regression of lung squamous cell carcinoma*. Oncotarget. 2016 Dec 20;7(51):85063-85078. doi: 10.18632/oncotarget.13195.

Otros artículos:

Millán-Uclés Á, Zuluaga S, Marqués M, **Vallejo-Díaz J**, Sanz L, Cariaga-Martínez AE, Real FX, Carrera AC. *E-cadherin downregulation sensitizes PTEN-mutant tumors to PI3K β silencing*. Oncotarget. 2016 Dec 20;7(51):84054-84071. doi: 10.18632/oncotarget.13414.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2014;**136**:E359–86.
2. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K *et al.* Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:13784–9.
3. Hou J, Aerts J, den Hamer B *et al.* Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PLoS One* 2010;**5**:e10312.
4. Wachi S, Yoneda K, Wu R. Interactome-transcriptome analysis reveals the high centrality of genes differentially expressed in lung cancer tissues Shinichiro. *Bioinformatics* 2005;**21**:4205–8.
5. Chan BA, Hughes BGM. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res* 2015;**4**:36–54.
6. Campbell JD, Alexandrov A, Kim J *et al.* Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2016;**48**:607–16.
7. Lovly CM, Horn L, Pao W. Molecular Profiling of Lung Cancer - My Cancer Genome. 2016.
8. Hammerman PS, Lawrence MS, Voet D *et al.* Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012;**489**:519–25.
9. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD *et al.* Effects of a Combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;**334**:1150–5.
10. Blumberg J, Block G. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study in Finland. *Nutr Rev* 1994;**52**:242–5.
11. Lippman SM, Lee JJ, Karp DD *et al.* Randomized phase III intergroup trial of isotretinoin to prevent second primary tumors in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;**93**:605–18.
12. van Zandwijk N, Dalesio O, Pastorino U *et al.* EUROSCAN, a randomized trial of vitamin A and N-acetylcysteine in patients with head and neck cancer or lung cancer. For the EUropean Organization for Research and Treatment of Cancer Head and Neck and Lung Cancer Cooperative Groups. *J Natl Cancer Inst* 2000;**92**:977–86.
13. Boxem AJM Van, Westerga J, Venmans BJW *et al.* Photodynamic therapy , Nd-YAG laser and electrocautery for treating early-stage intraluminal cancer : which to choose ? *Lung Cancer* 2001;**31**:31–6.

14. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999;**253**:239–54.
15. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 2015;**15**:7–24.
16. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Timms J *et al*. Synthesis and Function of 3-Phosphorylated Inositol Lipids. *Annu Rev Biochem* 2001;**70**:535–602.
17. Hurley JH, Misra S. Signaling and subcellular targeting by membrane-binging domains. *Annu Rev Biophysics Biomol Struct* 2000;**29**:49–79.
18. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci* 2014:923–8.
19. Murga C, Fukuhara S, Gutkind JS. A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J Biol Chem* 2000;**275**:12069–73.
20. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:317–30.
21. Voigt P, Dorner MB, Schaefer M. Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase γ that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* 2006;**281**:9977–86.
22. Stephens LR, Eguinoa a, Erdjument-Bromage H *et al*. The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 1997;**89**:105–14.
23. Arcaro A, Zvelebil MJ, Wallasch C *et al*. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:3817–30.
24. Jaber N, Zong WX. Class III PI3K Vps34: Essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann N Y Acad Sci* 2013;**1280**:48–51.
25. Tsuchiya A, Kanno T, Nishizaki T. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1 / 2 at Ser473 / 474 in the insulin signal transduction pathway. *J Endocrinol* 2014;**220**:49–59.
26. Yu J, Zhang Y, McIlroy J *et al*. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 1998;**18**:1379–87.
27. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2011;**2**:261–74.

28. Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O *et al.* The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* (80-) 2007;**318**:1744–8.
29. Ueki K, Fruman D a, Brachmann SM *et al.* Molecular Balance between the Regulatory and Catalytic Subunits of Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Cell Signaling and Survival Molecular Balance between the Regulatory and Catalytic Subunits of Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Cell Signaling and Survival. *Mol Cell Biol* 2002;**22**:965–77.
30. Cheung LWT, Walkiewicz KW, Besong TM *et al.* Regulation of the PI3K pathway through a p85a monomer-homodimer equilibrium. *Elife* 2015;**4**:1–28.
31. Jiménez C, Portela RA, Mellado M *et al.* Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol* 2000;**151**:249–61.
32. Campa CC, Ciraolo E, Ghigo A *et al.* Crossroads of PI3K and Rac pathways. *Small GTPases* 2015;**6**:71–80.
33. Wang Z, Dang T, Liu T *et al.* NEDD4L protein catalyzes ubiquitination of PIK3CA protein and regulates PI3K-AKT signaling. *J Biol Chem* 2016;**291**:17467–77.
34. García Z, Silio V, Marqués M *et al.* A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *EMBO J* 2006;**25**:4740–51.
35. Silió V, Marqués M, Cortés I *et al.* A cascade involving p85, Cdc42 and septin 2 regulates cytokinesis. *Biochem Soc Trans* 2007;**35**:222–4.
36. Cariaga-Martínez AE, Cortés I, García E *et al.* Phosphoinositide 3-kinase p85beta regulates invadopodium formation. *Biol Open* 2014;**3**:924–36.
37. Breitkopf SB, Yang X, Begley MJ *et al.* A Cross-Species Study of PI3K Protein-Protein Interactions Reveals the Direct Interaction of P85 and SHP2. *Sci Rep* 2016;**6**:20471.
38. Pérez-García V, Redondo-Muñoz J, Kumar A *et al.* Cell Activation-Induced Phosphoinositide 3-Kinase Alpha/Beta Dimerization Regulates PTEN Activity. *Mol Cell Biol* 2014;**34**:3359–73.
39. Maehama T, Dixon J e: The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J Biol Chem* 1998;**273**:13375–9.
40. Chagpar RB, Links PH, Pastor MC *et al.* Direct positive regulation of PTEN by the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci* 2010;**107**:5471–6.

41. Jiménez C, Hernández C, Pimentel B *et al.* The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J Biol Chem* 2002;**277**:41556–62.
42. Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling - Which way to target? *Trends Pharmacol Sci* 2003;**24**:366–76.
43. Arcaro A, Aubert M, Espinosa del Hierro ME *et al.* Critical role for lipid raft-associated Src kinases in activation of PI3K-Akt signalling. *Cell Signal* 2007;**19**:1081–92.
44. Hawkins PT, Jackson TR, Stephens LR. Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase. *Nature* 1992;**358**:157–9.
45. Burgering BMT, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH Kinase signal transduction. *Lett Nat* 1995;**376**:599.
46. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;**9**:59–71.
47. Nascimento EBM, Snel M, Guigas B *et al.* Phosphorylation of PRAS40 on Thr246 by PKB/AKT facilitates efficient phosphorylation of Ser183 by mTORC1. *Cell Signal* 2010;**22**:961–7.
48. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2009;**27**:2278–87.
49. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2014;**13**:140–56.
50. Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M *et al.* AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell* 2011;**19**:58–71.
51. Carracedo A, Ma L, Teruya-feldstein J *et al.* Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K- dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;**118**:3065–74.
52. Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans* 2012;**40**:139–46.
53. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;**36**:320–8.
54. Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci* 2016;**129**:1287–92.

55. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;**13**:283–96.
56. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;**4**:127–50.
57. Cheung LWT, Hennessy BT, Li J *et al*. High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov* 2011;**1**:170–85.
58. Mirzaa GM, Conti V, Timms AE *et al*. Characterisation of mutations of the phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit, PIK3R2, in perisylvian polymicrogyria: A next-generation sequencing study. *Lancet Neurol* 2015;**14**:1182–95.
59. Urlick ME, Rudd ML, Godwin AK *et al*. PIK3R1 (p85 α) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer Res* 2011;**71**:4061–7.
60. Rivière J, Mirzaa GM, Roak BJO *et al*. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 2013;**44**:934–40.
61. Nakamura K, Kato M, Tohyama J *et al*. AKT3 and PIK3R2 mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes: MCAP and MPPH. *Clin Genet* 2014;**85**:396–8.
62. Miller BW, Przepiorka D, De Claro RA *et al*. FDA approval: Idelalisib monotherapy for the treatment of patients with follicular lymphoma and small lymphocytic lymphoma. *Clin Cancer Res* 2015;**21**:1525–9.
63. Kwitkowski VE, Prowell TM, Ibrahim A *et al*. FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* 2010;**15**:428–35.
64. Castro MDM, Gomez MA, Kip AE *et al*. Pharmacokinetics of Miltefosine in Children and Adults with Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;**61**:e02198-16.
65. Yao JC, Fazio N, Singh S *et al*. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2016;**387**:968–77.
66. Demetri GD, Chawla SP, Ray-Coquard I *et al*. Results of an International Randomized Phase III Trial of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Ridaforolimus Versus Placebo to Control Metastatic Sarcomas in Patients After Benefit From Prior Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013;**31**:2485–92.

67. Massacesi C, di Tomaso E, Urban P *et al.* PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: Implications for clinical trial design. *Onco Targets Ther* 2016;**9**:203–10.
68. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD *et al.* The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* 2017;**170**:605–35.
69. Chandarlapaty S. Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer. *Cancer Discov* 2012;**2**:311–9.
70. Rozengurt E, Soares HP, Sinnet-Smith J. Suppression of Feedback Loops Mediated by PI3K/mTOR Induces Multiple Overactivation of Compensatory Pathways: An Unintended Consequence Leading to Drug Resistance. *Mol Cancer Ther* 2014;**13**:2477–88.
71. Huang H, Tindall DJ. Regulation of FOXO protein stability via ubiquitination and proteasome degradation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2011;**1813**:1961–4.
72. Herrera VA, Zeindl-Eberhart E, Jung A *et al.* The dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 is effective in lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 2011;**31**:849–54.
73. Foley TM, Payne SN, Pasch CA *et al.* Dual PI3K/mTOR Inhibition in Colorectal Cancers with APC and PIK3CA Mutations. *Mol Cancer Res* 2016:1–12.
74. Will M, Quin ACR, Toy W *et al.* Rapid induction of apoptosis by PI3K inhibitors is dependent upon their transient inhibition of RAS-ERK signaling. *Cancer Discov* 2014;**4**:334–47.
75. Costa C, Ebi H, Martini M *et al.* Measurement of PIP3 levels reveals an unexpected role for p110b in Early adaptive responses to p110a-Specific inhibitors in luminal breast cancer. *Cancer Cell* 2015;**27**:97–108.
76. Schwartz S, Wongvipat J, Trigwell CB *et al.* Feedback suppression of PI3K α signaling in PTEN-mutated tumors is relieved by selective inhibition of PI3K β . *Cancer Cell* 2015;**27**:109–22.
77. Cortés I, Sánchez-Ruíz J, Zuluaga S *et al.* P85B Phosphoinositide 3-Kinase Subunit Regulates Tumor Progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:11318–23.
78. Jögi A, Vaapil M, Johansson M *et al.* Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Ups J Med Sci* 2012;**117**:217–24.
79. Ito Y, Vogt PK, Hart JR. Domain analysis reveals striking functional differences between the regulatory subunits of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), p85 α and p85 β . *Oncotarget* 2017;**8**:55863–76.

80. Méndez J, Stillman B. Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:8602–12.
81. Marqués M, Kumar A, Cortés I *et al*. Phosphoinositide 3-kinases p110alpha and p110beta regulate cell cycle entry, exhibiting distinct activation kinetics in G1 phase. *Mol Cell Biol* 2008;**28**:2803–14.
82. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA *et al*. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;**25**:3389–402.
83. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM *et al*. Protein Database Searches Using Compositionally Adjusted Substitution Matrices. *FEBS J* 2005;**272**:5101–9.
84. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. 2007.
85. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;**9**:671–5.
86. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E *et al*. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;**9**:676–82.
87. Bhattacharjee a, Richards WG, Staunton J *et al*. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:13790–5.
88. Alcázar I, Cortés I, Zaballos A *et al*. p85b phosphoinositide 3-kinase regulates CD28 coreceptor function. *Blood* 2009;**113**:3198–208.
89. Scheid MP, Woodgett JR. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* 2003;**546**:108–12.
90. Wiza C, Nascimento EBM, Ouwens DM. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *AJP Endocrinol Metab* 2012;**302**:E1453–60.
91. Chung J, Grammer TC, Lemon KP *et al*. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 1994;**370**:71–5.
92. Wiederschain D, Susan W, Chen L *et al*. Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle* 2009;**8**:498–504.
93. Castellano E, Santos E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* 2011;**2**:216–31.
94. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H *et al*. COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* 2017;**45**:D777–83.

95. Jančík S, Drábek J, Radzioch D *et al.* Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010;**2010**, DOI: 10.1155/2010/150960.
96. Saykali BA, El-Sibai M. Invadopodia, Regulation, and Assembly in Cancer Cell Invasion. *Cell Commun Adhes* 2014;**21**:207–12.
97. Xia H, Nho RS, Kahm J *et al.* Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a $\alpha 1$ integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem* 2004;**279**:33024–34.
98. Guan JL, Trevithick JE, Hynes RO. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul* 1991;**2**:951–64.
99. Zhao X, Guan J-L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;**63**:610–5.
100. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA *et al.* FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 2004;**6**:154–61.
101. Meng XN, Jin Y, Yu Y *et al.* Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2009;**101**:327–34.
102. Bosma MJ, Carroll AM. THE SCID MOUSE MUTANT: Definition, Characterization, and Potential Uses. *Annu Rev Immunol* 1991;**9**:323–50.
103. Shibata S, Asano T, Ogura a *et al.* SCID-bg mice as xenograft recipients. *Lab Anim* 1997;**31**:163–8.
104. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;**182**:311–22.
105. Harrington LS, Findlay GM, Gray A *et al.* The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol* 2004;**166**:213–23.
106. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 2008;**27**:5527–41.
107. Akinleye A, Avvaru P, Furqan M *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol* 2013;**6**:1–17.
108. Folgiero V, Di Carlo SE, Bon G *et al.* Inhibition of p85, the non-catalytic subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, exerts potent antitumor activity in human breast cancer cells. *Cell Death Dis* 2012;**3**:e440.
109. Thoreen CC, Sabatini DM. Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy* 2009;**5**:725–6.

110. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;**68**:850–8.
111. Kumar A, Redondo-Munoz J, Perez-Garcia V *et al.* Nuclear but Not Cytosolic Phosphoinositide 3-Kinase Beta Has an Essential Function in Cell Survival. *Mol Cell Biol* 2011;**31**:2122–33.
112. Rajanala K, Nandicoori VK. Localization of Nucleoporin Tpr to the Nuclear Pore Complex Is Essential for Tpr Mediated Regulation of the Export of Unspliced RNA. *PLoS One* 2012;**7**, DOI: 10.1371/journal.pone.0029921.
113. López-soop G, Rønningen T, Rogala A *et al.* AKAP95 interacts with nucleoporin TPR in mitosis and is important for the spindle assembly checkpoint. *Cell Cycle* 2017;**16**:947–56.
114. Kobayashi A, Hashizume C, Dowaki T *et al.* Therapeutic potential of mitotic interaction between the nucleoporin Tpr and aurora kinase A. *Cell Cycle* 2015;**14**:1447–58.
115. Nakano H, Funasaka T, Hashizume C *et al.* Nucleoporin Translocated Promoter Region (Tpr) Associates with Dynein Complex , Preventing Chromosome Lagging Formation during Mitosis. *J Biol Chem* 2010;**285**:10841–9.
116. Passacantilli I, Frisone P, De Paola E *et al.* hnRNPM guides an alternative splicing program in response to inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in Ewing sarcoma cells. *Nucleic Acids Res* 2017, DOI: 10.1093/nar/gkx831.
117. Kumar A, Fernandez-Capetillo O, Fernandez-Capetillo O *et al.* Nuclear phosphoinositide 3-kinase beta controls double-strand break DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:7491–6.
118. Kong L, Schäfer G, Bu H *et al.* Lamin A/C protein is overexpressed in tissue-invading prostate cancer and promotes prostate cancer cell growth, migration and invasion through the PI3K/AKT/PTEN pathway. *Carcinogenesis* 2012;**33**:751–9.
119. Jewer M, Findlay SD, Postovit LM. Post-transcriptional regulation in cancer progression Microenvironmental control of alternative splicing and translation. *J Cell Commun Signal* 2012;**6**:233–48.
120. Feinberg AP, Koldobskiy MA, Göndör A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet* 2016;**17**:284–99.
121. Albertson DG. Gene amplification in cancer. *Trends Genet* 2006;**22**:447–55.

122. Ito Y, Hart JR, Ueno L *et al.* Oncogenic activity of the regulatory subunit p85beta of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**:16826–9.
123. Thorpe LM, Spangle JM, Ohlson CE *et al.* PI3K-p110 α mediates the oncogenic activity induced by loss of the novel tumor suppressor PI3K-p85 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;**114**:7095–100.
124. Taniguchi CM, Winnay J, Kondo T *et al.* The phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling. *Cancer Res* 2010;**70**:5305–15.
125. Mukherjee B, Tomimatsu N, Amancherla K *et al.* The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses. *Neoplasia* 2012;**14**:34–43.
126. Gravina GL, Mancini A, Scarsella L *et al.* Dual PI3K/mTOR inhibitor, XL765 (SAR245409), shows superior effects to sole PI3K [XL147 (SAR245408)] or mTOR [rapamycin] inhibition in prostate cancer cell models. *Tumor Biol* 2016;**37**:341–51.
127. Silió V, Redondo-Muñoz J, Carrera AC. Phosphoinositide 3-kinase β regulates chromosome segregation in mitosis. *Mol Biol Cell* 2012;**23**:4526–42.
128. Kumar A, Carrera AC. New functions for PI3K in the control of cell division. *Cell Cycle* 2007;**6**:1696–8.
129. Redondo-Muñoz J, Rodríguez MJ, Silió V *et al.* Phosphoinositide 3-kinase beta controls replication factor C assembly and function. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:855–68.
130. Marqués M, Kumar A, Poveda AM *et al.* Specific function of phosphoinositide 3-kinase beta in the control of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:7525–30.
131. Jiang A, Lu H, Zhang D *et al.* Short hairpin RNA targeting AKT1 and PI3K/p85 suppresses the proliferation and self-renewal of lung cancer stem cells. *Mol Med Rep* 2015:363–70.
132. Rajanala K, Sarkar A, Jhingan GD *et al.* Phosphorylation of nucleoporin Tpr governs its differential localization and is required for its mitotic function. *J Cell Sci* 2014;**127**:3505–20.
133. Redondo-Muñoz J, Pérez-García V, Rodríguez MJ *et al.* Phosphoinositide 3-kinase beta protects nuclear envelope integrity by controlling RCC1 localization and Ran activity. *Mol Cell Biol* 2015;**35**:249–63.

134. Song MS, Carracedo A, Salmena L *et al.* Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;**14**:187–99.
135. Kanu N, Zhang T, Burrell RA *et al.* RAD18 , WRNIP1 and ATMIN promote ATM signalling in response to replication stress. *Oncogene* 2015:1–11.
136. Campa CC, Martini M, Santis MC De *et al.* How PI3K-derived lipids control cell division. *Front Cell Dev Biol* 2015;**3**:1–9.
137. Boronenkov I V, Loijens JC, Umeda M *et al.* Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell* 1998;**9**:3547–60.
138. Lindsay Y, McCoull D, Davidson L *et al.* Localization of agonist-sensitive PtdIns(3,4,5)P₃ reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression. *J Cell Sci* 2006;**119**:5160–8.
139. Siegfried Z, Bonomi S, Ghigna C *et al.* Regulation of the Ras-MAPK and PI3K-mTOR Signalling Pathways by Alternative Splicing in Cancer. *Int J Cell Biol* 2013.
140. Bertacchini J, Beretti F, Cenni V *et al.* The protein kinase Akt/PKB regulates both prelamin A degradation and Lmna gene expression. *FASEB J* 2013;**27**:2145–55.
141. Marmiroli S, Bertacchini J, Beretti F *et al.* A-type lamins and signaling: The PI 3-kinase/Akt pathway moves forward. *J Cell Physiol* 2009;**220**:553–64.
142. Dechat T, Gesson K, Foisner R. Lamina-Independent Lamins in the Nuclear Interior Serve Important Functions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2010;**LXXV**, DOI: 10.1101/sqb.2010.75.018.